

**IN-VITRO STUDIEN  
ZUM INTESTINALEN LYSIN-TRANSPORT  
BEI REGENBOGENFORELLEN  
(SALMO GAIIRDNERII R.)**

**Hans-Werner Wagner**

Disbui. München

1989



Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie  
und Ernährungsphysiologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von:  
Prof. Dr. J. Gropp

IN-VITRO STUDIEN  
ZUM INTESTINALEN LYSIN-TRANSPORT  
BEI REGENBOGENFORELLEN (SALMO GAIRDNERII R.)

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Hans-Werner Wagner  
aus  
Oberthal

München, 1989

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M. Rüsse

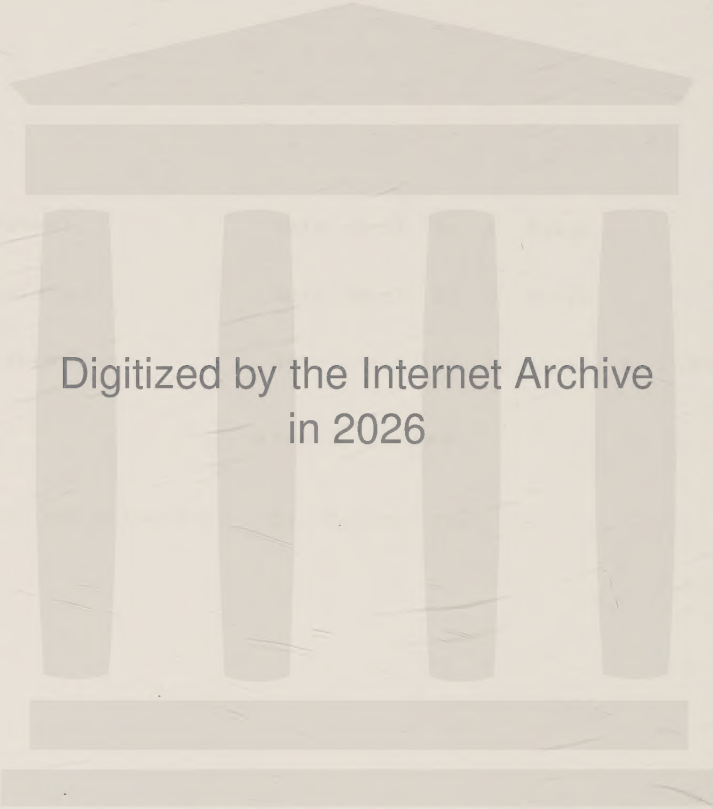
Referent Univ.-Prof. Dr. J. Gropp

Korreferent Univ.-Prof. Dr. Dr.habil. R. Hoffmann

Tag der Promotion: 24. Februar 1989

Meinen Eltern

## Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554801\\_0099](https://archive.org/details/IA41554801_0099)

# INHALTSVERZEICHNIS

# SEITE

|         |                                                                                 |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | EINLEITUNG                                                                      | 1  |
| 2       | LITERATURÜBERSICHT                                                              | 3  |
| 2.1     | Gastrointestinale Absorption von Nahrungsprotein                                | 3  |
| 2.1.1   | Intakte Proteinmakromoleküle                                                    | 4  |
| 2.1.2   | Peptide                                                                         | 5  |
| 2.1.3   | Aminosäuren                                                                     | 7  |
| 2.2     | Intestinaler Aminosäuretransport                                                | 9  |
| 2.2.1   | Transportsysteme der Bürstensaummembran                                         | 10 |
| 2.2.2   | Energetisierung des intestinalen Aminosäurentransportes                         | 11 |
| 2.2.3   | Aminosäuretransport im Darm von Fischen                                         | 12 |
| 3       | MATERIAL UND METHODEN                                                           | 17 |
| 3.1     | Versuchstiere, Haltung und Fütterung                                            | 17 |
| 3.1.1   | Versuche zum transmuralen Lysin-Transport                                       | 18 |
| 3.1.2   | Versuche zur Kinetik der Lysinabsorption                                        | 19 |
| 3.2     | Chemikalien                                                                     | 19 |
| 3.2.1   | Pufferlösung                                                                    | 20 |
| 3.3     | Zusammensetzung der Versuchslösungen                                            | 20 |
| 3.4     | Versuchstechnik                                                                 | 21 |
| 3.4.1   | Präparation des Darmes                                                          | 22 |
| 3.4.2   | Transmuraler Lysin-Transport                                                    | 22 |
| 3.4.2.1 | Versuchsauswertung                                                              | 24 |
| 3.4.3   | Chromatographie                                                                 | 26 |
| 3.4.4   | Kinetik der Lysinabsorption                                                     | 27 |
| 3.4.4.1 | Versuchsauswertung                                                              | 27 |
| 3.5     | Statistik                                                                       | 29 |
| 4       | VERSUCHSERGEBNISSE                                                              | 30 |
| 4.1     | Transmuraler Transport von $^3\text{H}$ -L-Lysin                                | 30 |
| 4.1.1   | Zuverlässigkeit der $^3\text{H}$ -Markierung                                    | 30 |
| 4.1.2   | Lysin-Transport im Darm junger Forellen (Versuch A)                             | 32 |
| 4.1.2.1 | Einfluß der Inkubationsdauer                                                    | 32 |
| 4.1.2.2 | Einfluß von Temperatur und Substratkonzentration des Inkubationsmediums         | 34 |
| 4.1.3   | Lysin-Transport im Darm adulter Forellen (Versuch B)                            | 38 |
| 4.1.3.1 | Einfluß der Inkubationsdauer                                                    | 38 |
| 4.1.3.2 | Einfluß von Temperatur und Substratkonzentration                                | 39 |
| 4.1.4   | Vergleich des transmuralen Lysin-Transportes bei Jungfischen und adulten Tieren | 41 |

|       |                                                                               |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2   | Kinetik der intestinalen L-Lysinabsorption                                    | 44 |
| 4.2.1 | Konzentrationsabhängigkeit der Lysinaufnahme                                  | 44 |
| 4.2.2 | Effekt von 2,4 Dinitrophenol und Ouabain auf den intestinalen Lysin-Transport | 53 |
| 5     | DISKUSSION                                                                    | 57 |
| 5.1   | Transmuraler Lysin-Transport                                                  | 57 |
| 5.2   | Kinetik der L-Lysinabsorption                                                 | 60 |
| 6     | ZUSAMMENFASSUNG                                                               | 64 |
| 7     | SUMMARY                                                                       | 65 |
| 8     | LITERATURVERZEICHNIS                                                          | 66 |
| 9     | ANHANG                                                                        | 82 |

## 1. EINLEITUNG

Seit der Entwicklung geeigneter in-vitro Methoden zu Beginn der 50er Jahre (WISEMAN, 1951, WILSON und WISEMAN, 1954) konnte die Fähigkeit des isolierten Darmes zum aktiven transmuralen Transport von Nichtelektrolyten für eine Vielzahl von Wirbeltieren etabliert werden (LERNER, 1978). Auch für Süßwasserfische und einige im Meer lebende Arten konnte die intestinale Absorption von Aminosäuren und Monosacchariden gegen ein Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden (WILSON, 1957; READ et al., 1960; CARLISKY und HUANG, 1962; ROUT et al., 1965; NEFF und MUSACCHIA, 1967; SMITH, R.L., 1969; SMITH, M.W. 1970).

Die von ALVARADO und MONREAL (1967) aus vergleichenden Untersuchungen an Vögeln und Säugern abgeleitete Forderung nach phylogenetisch identischen "Carriermechanismen" im Darm der meisten Vertebraten wird auch durch zahlreiche Beobachtungen an Fischen unterstützt. Insbesondere die Abhängigkeit des aktiven Transportes von einem intakten Energiestoffwechsel der Zelle, sowie die elektrochemische Kopplung mit Natriumionen konnte in zahlreichen in-vitro Experimenten mit verschiedenen Stoffwechselinhibitoren (HUANG und ROUT, 1967; BOG~~x~~ et al., 1979b; GARG, 1981b), unterschiedlichen Na<sup>+</sup>-Konzentrationen (SMITH und ELLORY, 1971; CHEN und HUANG, 1972; HERRERA und JORDANA, 1973; BOG~~x~~ et al., 1977, 1982; GARG, 1981b), sowie durch elektro-physiologische Studien (MEPHAM und SMITH, 1966a; SMITH, 1966; BUCLON, 1974; ALBUS und SIEGENBEEK VAN HEUKELOM, 1976; ALBUS et al., 1983a,b; THOMPSON und KLEINZELLER, 1985) dokumentiert werden.

Dagegen liegen nur sehr wenige Untersuchungen über die Kinetik aktiver Transportprozesse im Darm von Fischen vor, die zudem auf den Transport neutraler Aminosäuren beschränkt blieben (READ, 1967; KITCHIN und MORRIS, 1971; CARTIER et al., 1979). Bei Regenbogenforellen sind bisher lediglich die Kinetik des L-Leucin- (INGHAM und ARME, 1977) und des Glycintransportes (BOG~~x~~ et al., 1979a) beschrieben worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die intestinale Absorption basischer Aminosäuren bei Regenbogenforellen (*Salmo gairdnerii*) am Beispiel des in-vitro Transportes von  $^3\text{H}$ -L-Lysin näher zu charakterisieren. Neben der Untersuchung des transmuralen Lysintransportes an juvenilen und adulten Forellen bei verschiedenen Inkubationstemperaturen, galt ein besonderes Interesse der Kinetik und Topographie der L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembran der Enterozyten.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

Carnivore Fische, insbesondere aber Salmoniden wie die Regenbogenforelle, deren "natürliche" Nahrung etwa 60 % Rohprotein enthält, haben einen zwei- bis dreimal so hohen Eiweißbedarf wie Säuger und Vögel (MERTZ, 1972; OGINO, 1980). Der Bedarf für optimales Wachstum, der außer von der Proteinqualität, der Energieversorgung und dem Alter der Tiere auch durch verschiedene Umweltfaktoren wie der Temperatur und der Salinität des Wassers beeinflusst wird (DELONG et al., 1958; ZEITOUN, 1974), spiegelt sich in den hohen Rohproteingehalten (40 -50 %) kommerzieller Futtermischungen für Salmoniden wider.

Obwohl damit der Verdauung des Nahrungsproteins, ebenso wie der Absorption einzelner (synthetischer) Aminosäuren (RUMSEY und KETOLA, 1975) bei Nutzfischen auch eine ökonomische Bedeutung zukommt, wurde den grundlegenden Fragen der Proteinhydrolyse, ihren Endstufen und deren Absorption relativ wenig Beachtung geschenkt. Die Verdauungsphysiologie der Fische ist in dieser Hinsicht bei weitem nicht so gut untersucht wie die der homoiothermen Vögel und Säuger. Dabei ist es wahrscheinlich, zumindestens jedoch möglich, daß nicht alle aus der Physiologie höherer Vertebraten übernommenen Voraussetzungen auch für Fische in vollem Umfang zutreffen (SCHUBERT, 1979).

### 2.1 Gastrointestinale Absorption von Nahrungsprotein

Die Aufnahme von Nahrungsprotein bei Fischen kann prinzipiell sowohl durch epithelialen Transport von Aminosäuren (READ, 1967; KEMP und SMITH, 1970; INGHAM und ARME, 1977; CARTIER et al., 1979; HOKAZONO et al., 1979; BOG& et al., 1978, 1979ab, 1982) und Peptiden (ASH, 1980; BOG& et al., 1981), als auch durch die Pinozytose intakter Proteinmakromoleküle erfolgen (STROBAND und DEBETS, 1978; EZEASOR und STOKOE, 1981).

### 2.1.1 Intakte Proteinmakromoleküle

Die Aufnahme intakter Eiweißmakromoleküle durch Pinozytose im Darm höherer Wirbeltiere ist vor allem im Hinblick auf die Absorption von Kolostrumantikörpern von Bedeutung. Die Fähigkeit des Dünndarmes neugeborener Ferkel (LECCE, 1966), von Kälbern (PIERCE, 1960) und Fohlen (BRAMBELL, 1958) zur Aufnahme nativer Gamma-Globuline ist allerdings auf eine sehr kurze Periode unmittelbar nach der Geburt beschränkt. Lediglich neugeborene Ratten und Mäuse können Protein bis zu 3 Wochen nach der Geburt unverändert absorbieren (ANDERSON, 1964). Adulte Säuger einschließlich des Menschen können zwar gleichfalls immunologisch nachweisbare Mengen nativer Eiweißmoleküle absorbieren, vom Standpunkt der Ernährung sind diese Mengen jedoch vernachlässigbar klein (DAVENPORT, 1971).

Im Darm von Fischen konnte die Pinozytose von Proteinmakromolekülen zunächst bei adulten, magenlosen Cypriniden (YAMAMOTO, 1966; NOILLAC-DEPEYRE und GAS, 1973; STROBAND et al., 1979) und Forellenbrut (IWAI, 1968) nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde die intestinale Absorption von nativem Eiweiß als Ausgleich für die fehlende Pepsinverdauung gewertet.

Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen am Darm adulter Regenbogenforellen (EZEASOR und STOKOE, 1981) belegen jedoch, daß auch bei Fischen mit funktionellem Magen die Fähigkeit zur Pinozytose erhalten bleibt. Im Hinblick auf den hohen Eiweißbedarf der Salmoniden interpretierten die beiden Autoren das Fortbestehen der Proteinabsorption im Rektum adulter Forellen, sowie die Koexistenz extra- und intrazellulärer Eiweißverdauung als Möglichkeit, eine optimale Absorption von Nahrungsprotein zu sichern. Insbesondere nach der Aufnahme großer Futtermengen, wenn infolge der häufigeren Magenentleerung die Proteinhydrolyse unvollständig bleibt, soll der Pinozytose nativer Eiweißmoleküle eine größere Bedeutung zukommen.

HOFER (1982) stellte bei der Untersuchung des Darminhaltes von magenlosen Cypriniden (*Rutilus rutilus* L.) eine starke Abnahme

des Gehaltes an proteolytischen Enzymen im letzten Darmdrittel fest. Da sich diese als sehr stabil gegenüber einer alkalischen Hydrolyse erwiesen, schloß der Autor auf eine Reabsorption und Rezirkulation körpereigener Proteasen in unveränderter Form. Hofer bewertete die beobachtete Pinozytose als Sparmechanismus für körpereigene proteolytische Enzyme bei magenlosen Fischen und schätzte die Effektivität dieser Reabsorption wesentlich höher ein als die Aufnahme von löslichem Nahrungsprotein.

### 2.1.2 Peptide

Als Endprodukte der intraluminalen Eiweißverdauung fällt im Dünndarm von Säugern ein Gemisch aus freien Aminosäuren und kleinen Peptiden, insbesondere von Di- und Tripeptiden an. ADIBI und MERCER (1973) fanden im Dünndarm des Menschen eine im Vergleich zu den freien Aminosäuren etwa fünfmal höhere Konzentration der in Peptidform vorliegenden Aminosäuren.

Di- und Tripeptide können ähnlich wie freie Aminosäuren durch spezifische Transportsysteme aktiv in das Dünndarmepithel aufgenommen werden. Dort werden sie so gut wie vollständig hydrolysiert und gelangen somit fast ausschließlich als freie Aminosäuren in die Blutbahn (MATTHEWS, 1975; ADIBI und KIM, 1981; MATTHEWS und BURSTON, 1983). Die maximale Absorptionskapazität für Peptide bzw. freie Aminosäuren scheint dabei in verschiedenen Dünndarmabschnitten lokalisiert zu sein. So werden kleine Peptide bei der Ratte maximal in der proximalen Hälfte des Dünndarms absorbiert, während freie Aminosäuren am schnellsten in der distalen Hälfte aufgenommen werden (MATTHEWS, 1975).

Untersuchungen an verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte und Schwein) zeigen dabei, daß in Form von kleinen Peptiden vorliegende Aminosäuren im allgemeinen schneller absorbiert werden als die entsprechenden freien Aminosäuren (ADIBI und KIM, 1981; GANAPATHY und LEIBACH, 1982; STEINHARDT und ADIBI, 1986). Die Transportkapazität der Bürstensaummembran für Peptide scheint größer zu sein als für die einzelnen Aminosäuren, wobei der

Peptidtransport zudem durch die rasche Hydrolyse begünstigt wird (FRIEDRICH, 1982). Damit kommt der Absorption von Oligopeptiden, neben dem epithelialen Transport freier Aminosäuren, bei Mammaliern eine erhebliche quantitative Bedeutung bei der Absorption von Nahrungsprotein zu (SCHARRER, 1986).

Ein vergleichbares Konzept, das die Funktion der Bürstensaummembran im Darm von Säugern als "digestiv-absorptive Oberfläche" (CRANE, 1968) beschreibt, konnte für die poikilothermen Fische bisher nicht entwickelt werden. Erste Schritte in diese Richtung beschränken sich dabei auf die von ASH (1979, 1980), sowie der Arbeitsgruppe um BOGÆ (1981a) an Regenbogenforellen durchgeführten Untersuchungen.

ASH (1979, 1980) konnte in allen Abschnitten des Magen-Darmkanals Dipeptidasen nachweisen, die sowohl in der Bürstensaummembran (Phenylalanylglycin- Hydrolase) als auch im Zytoplasma (Glycylleucin- und Glycylphenylalanin- Hydrolase) der Mucosazellen lokalisiert waren. Während in der Magenschleimhaut nur sehr geringe Peptidaseaktivitäten nachweisbar waren, konnte in den daran anschließenden Darmabschnitten ein Anstieg der Enzymaktivität von proximal (Mitteldarm) nach distal (Rektum) festgestellt werden. Die größte hydrolytische Gesamtkapazität wurde allerdings der Mucosa in den Pylorusanhängen zugeschrieben. Der Nachweis zytoplasmatischer Peptidasen im Darm von Fischen läßt die Vermutung zu, daß ähnlich wie bei Säugern intakte Dipeptide absorbiert werden können.

BOGÆ et al. (1981a) stellten bei der in-vivo Perfusion des Forellendarmes fest, daß Glycin schneller absorbiert wurde, wenn es in hoher Konzentration (100 mM) als Dipeptid (Glycylglycin) in der Perfusionslösung vorlag. Die insgesamt absorbierte Glycinmenge war allerdings nicht höher als bei der Absorption aus einer äquivalenten (200 mM) Lösung der freien Aminosäure. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden bei Säugern, in deren Darm Glycin generell besser in Form von kleinen Peptiden absorbiert wird (HELLIER et al., 1972; HEADING et al., 1977). Außerdem

wurde Glycylglycin während der Perfusionsversuche hydrolysiert, so daß der Anteil der Peptidform an der Gesamtaufnahme nicht exakt bestimmt werden konnte.

Eine definitive Klärung der Frage, ob und inwieweit die aktive Absorption intakter Peptide im Darm von Fischen ähnlich wie bei Säugern erfolgt, dürfte deshalb erst durch Transportstudien mit nicht hydrolysierbaren Peptiden möglich sein.

### 2.1.3 Aminosäuren

Im Darminhalt von Fischen ist der Anteil freier Aminosäuren am Gesamtaminosäuregehalt weitaus höher als bei Säugern, in deren Ingesta der größte Teil der freigesetzten Aminosäuren in Peptidform vorliegt (CHUNG et al, 1979). So konnte DABROWSKI (1983a) im proximalen Rumpfdarm von Karpfen 3 h nach der Fütterung einen Anteil von 86 % freier Aminosäuren am Gesamtaminosäuregehalt der Ingesta feststellen. Ähnlich hohe Werte wurden auch im Mitteldarm von Regenbogenforellen, allerdings erst 14 h nach der Fütterung gefunden (DABROWSKI und DABROWSKA, 1981). Allein schon durch diese Befunde werden die Bedeutung der Pinozytose von Eiweißmakromolekülen und des epithelialen Transportes von Peptiden für die Absorption von Nahrungsprotein bei Fischen in Frage gestellt.

DABROWSKI (1983b) fand im Darminhalt konventionell gefütterter Karpfen und Forellen molare Konzentrationen freier Aminosäuren, die um ein Vielfaches höher waren als in den Ingesta von Säugern (NIXON und MAWER, 1970) und Reptilien (COULSON und HERNANDEZ, 1970). Eine Übersicht über die entsprechenden Untersuchungsergebnisse ist in Tabelle 1 wiedergegeben.

Möglicherweise ist deshalb nicht die intraluminale Eiweißhydrolyse, sondern die anschließende Absorption der Aminosäuren durch das Darmepithel der limitierende Schritt bei der Absorption von Nahrungsprotein-N im Darm von Fischen. So konnte auch durch die Injektion von Aminosäurelösungen (0,665-12,5 mmol/kg)

in den Darm von Karpfen (YARZOMBK et al., 1981) keine nennenswerte Steigerung der Absorptionsrate gegenüber der Aminosäurenaufnahme aus verdauten Futterprotein festgestellt werden (DABROWSKI, 1983b).

**Tabelle 1:** Konzentration freier Aminosäuren im Darm von Fischen, Reptilien und Säugern (nach DABROWSKI, 1983b). Alle Angaben in mmol/l Ingestawasser.

| AMINOSÄURE        | KARPFEN <sup>1</sup> | FORELLE <sup>2</sup> | CAYMAN <sup>3</sup> | MENSCH <sup>4</sup> |
|-------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Phenylalanin      | 4,67                 | 3,63                 | 1,20                | 0,19                |
| Tyrosin           | 3,68                 | 3,11                 | 1,28                | 0,23                |
| Leucin            | 8,95                 | 8,95                 | 1,80                | 0,19                |
| Isoleucin         | 5,98                 | 5,75                 | 0,36                | 0,08                |
| Methionin         | 4,89                 | 3,95                 | 0,48                | 0,06                |
| Valin             | 6,29                 | 6,66                 | 0,60                | 0,15                |
| Alanin            | 6,31                 | 7,89                 | 1,78                | 0,16                |
| Glycin            | 4,50                 | 6,16                 | 1,68                | 0,20                |
| Glutaminsäure     | 5,58                 | 7,71                 | 1,40                | 0,58                |
| Serin             | 5,71                 | 8,06                 | 0,15                | 0,16                |
| Threonin          | 6,45                 | 6,41                 | 1,20                | 0,13                |
| Asparaginsäure    | 3,56                 | 3,41                 | 0,12                | 0,14                |
| Arginin           | 6,76                 | 6,24                 | 0,40                | 0,35                |
| Histidin          | 2,71                 | 2,45                 | 0,29                | 0,18                |
| Lysin             | 11,18                | 7,63                 | 0,84                | 0,70                |
| Gesamtaminosäuren | 93,00                | 98,82                | 13,58               | 3,72                |

- <sup>1</sup> DABROWSKI, 1983a: *Cyprinus carpio* L.: Mittelwerte verschiedener Darmabschnitte 3h nach Fütterung einer Testdiät auf Fischmehlbasis; Wassertemperatur: 22°C.
- <sup>2</sup> DABROWSKI, 1983b: *S. gairdneri* Rich.: Mittelwerte aus verschiedenen Darmabschnitten (ohne Magen) 14h nach Fütterung einer Testmahlzeit auf Fischmehlbasis; Wassertemperatur: 15°C.
- <sup>3</sup> COULSON und HERNANDEZ, 1970: 18 h nach der Verfütterung von rohem Fisch; Haltungstemperatur: 28°C.
- <sup>4</sup> NIXON und MAWER, 1970: 3h nach dem Verzehr einer Milch-Testmahlzeit.

## 2.2 Intestinaler Aminosäuretransport

Die weitaus meisten der heutigen Vorstellungen über die Mechanismen des aktiven Aminosäuretransportes im Darm wurden aus Untersuchungen an homoiothermen Vögeln und Säugern abgeleitet. Für poikilotherme Tiere liegen dagegen relativ wenige Daten vor. Die bisherigen Untersuchungen an Fischen zeigen, daß gewisse Analogien im Transport von Aminosäuren (Glycin, L-Alanin, L-Phenylalanin und L-Prolin) bestehen. Mögliche Unterschiede zu den Verhältnissen bei höheren Wirbeltieren ergeben sich vor allem aus der unmittelbaren Beeinflussung des poikilothermen Organismus durch Umweltfaktoren, insbesondere durch die Temperatur, aber auch durch den Sauerstoff- und Schadstoffgehalt des Wasser (P&R&S, 1979).

Nach heutigen Kenntnissen erfolgt die Absorption von Aminosäuren durch das Darmepithel in zwei getrennten Schritten. So werden die Aminosäuren zunächst aktiv über die Bürstensaummembran (BSM) in die Epithelzelle transportiert. Anschließend verlassen sie dann die Mucosazelle mittels erleichterter Diffusion über die Basolateralmembran (SCHARRER, 1986).

Der Transport der Aminosäuren durch die Bürstensaummembran (BSM) erfolgt dabei über spezifische "Carriersysteme" gegen einen elektrochemischen Gradienten (SCHULTZ und CURRAN, 1970). Diese saturablen Mechanismen, die die Gesetze der Michaelis-Menten-Kinetik befolgen, erfordern neben der Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen einen intakten Energiestoffwechsel der Zelle (CURRAN et al., 1967, PRESTON et al., 1974). In der BSM existieren gruppenspezifische Transportsysteme für neutrale, basische und saure Aminosäuren, sowie ein weiteres für die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin (LERNER, 1978; SCHARRER, 1986).

### 2.2.1 Transportsysteme der Bürstensaummembran

Aufgrund des kompetitiven Verhaltens beim aktiven intestinalen Transport wurde ein gemeinsames Transportsystem für verschiedene neutrale Aminosäuren inklusive Histidin gefordert (PRESTON et al., 1974). Strukturelle Voraussetzungen für einen effektiven Transport neutraler Aminosäuren sind dabei neben der L-Form der Aminosäuren, eine freie COOH-Gruppe, eine  $\alpha$ -ständige  $\text{NH}_2$ -Gruppe, ein  $\alpha$ -ständiges H-Atom, sowie eine Seitenkette ohne elektrische Ladung (SCHULTZ et al., 1972; MUNCK, 1981).

In der Bürstensaummembran sollen dabei mehrere verschiedene Carrier für neutrale Aminosäuren existieren (STEVENS et al., 1982). Allerdings bestehen bezüglich der Zahl der beteiligten Transportsysteme zum Teil erhebliche Meinungsunterschiede. So wurden ursprünglich 5 verschiedene Carrier für den Transport neutraler Aminosäuren im Darm von Mammaliern gefordert (WISEMAN, 1968), während spätere Untersuchungen zur Annahme eines einzigen Transportsystems führten (PRESTON et al., 1974). Nach heutiger Kenntnis erfolgt der Transport neutraler Aminosäuren über zwei Systeme, und zwar über einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Carrier mit hoher Substrataffinität und geringer Transportkapazität und über einen weiteren,  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Carrier mit umgekehrten Eigenschaften (SEPULVEDA und SMITH, 1978; STEVENS et al., 1982).

Für die Iminosäuren Prolin und Hydroxyprolin existiert ein weiterer  $\text{Na}^+$ -abhängiger Carrier in der BSM von Mammaliern, dessen Stereospezifität wenig ausgeprägt ist und der auch eine geringe Affinität zu neutralen Aminosäuren aufweist (MUNCK, 1981; STEVENS und WRIGHT, 1985).

Auch für die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin, Ornithin und Cystin sind in der Bürstensaummembran spezifische Carrier vorhanden (HAGIHIRA et al., 1961). Die Transportkapazität dieses Systems scheint allerdings sehr gering zu sein. So werden die basischen Aminosäuren nur mit etwa 5 - 10 % der Geschwindigkeit neutraler Aminosäuren transportiert (DAVENPORT, 1971).

MUNCK und SCHULTZ (1969) führen die geringe Nettotransportrate von Lysin dabei auf einen hohen Efflux der Aminosäure über die Basolateralmembran zurück. Der Transport basischer Aminosäuren durch die BSM erfolgt möglicherweise sowohl über einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen, als auch über einen  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Carrier (MUNCK, 1985).

Für die sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure konnte infolge der weitgehenden Metabolisierung im Dünndarm mit der everted-sac-Technik zunächst kein transepithelialer Transport gegen ein Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden. Der Nachweis eines aktiven  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transportes dieser Aminosäuren durch die BSM der Mucosazellen des Darmes gelang erst an isolierten Bürstensaummembranvesikeln (BERTELOOT, 1984).

#### 2.2.2 Energetisierung des intestinalen Aminosäuretransportes

Untersuchungen an isolierten Bürstensaummembranvesikeln haben gezeigt, daß der epitheliale Transport von neutralen Aminosäuren und Iminosäuren über einen transmembranalen, elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten energetisiert wird, der durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe aufrechterhalten wird. (SIGRIST-NELSON et al., 1975; STEVENS et al., 1984). Aminosäuren und  $\text{Na}^+$  werden durch Cotransport in die Epithelzellen aufgenommen, was eine Steigerung der transepithelialen elektrischen Potentialdifferenz zur Folge hat (SCHULTZ und CURRAN, 1970). Während die Aminosäuren anschließend die Mucosazellen des Darmepithels durch erleichterte Diffusion verlassen, wird  $\text{Na}^+$  durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe über die basolaterale Membran ausgeschleust (SCHARRER, 1986).

Obwohl diese Verhältnisse vor allem für den Transport von neutralen Aminosäuren und Iminosäuren gelten, werden auch die sauren Aminosäuren über einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Prozeß in die Epithelzellen aufgenommen. An der Energetisierung des Transportes von Glutaminsäure und Asparaginsäure scheint jedoch neben dem

transmembranalen  $\text{Na}^+$ -Gradienten auch der physiologischerweise von der Epithelzelle ins Darmlumen gerichtete  $\text{K}^+$ -Gradient beteiligt zu sein (SCHARRER, 1986).

Wegen der geringen Transportkapazitäten des betreffenden Carriers, sowie der unspezifischen Bindung an die BSM konnte die Energetisierung des Transportes basischer Aminosäuren bisher noch nicht definitiv geklärt werden (SCHARRER, 1986). Teilweise wird der Transport dieser Aminosäuren durch den transmembranalen  $\text{Na}^+$ -Gradienten energetisiert (WOLFFRAM et al., 1984). Daneben kann die Absorption basischer Aminosäuren durch in der Epithelzelle akkumulierte neutrale Aminosäuren stimuliert werden, wobei ein Austauschtransport zwischen neutralen und basischen Aminosäuren stattfindet (HERZBERG und LERNER, 1973; MUNCK, 1984). REISER und CHRISTIANSEN (1973) konnten demonstrieren, daß basische Aminosäuren auch in Abwesenheit von  $\text{Na}^+$  gegen ein Konzentrationsgefälle in die Epithelzelle aufgenommen werden. Dabei dürfte die negative Ladung der Membraninnenseite die Triebkraft darstellen, da basische Aminosäuren eine positive Ladung tragen (SCHARRER, 1986).

### 2.2.3 Aminosäuretransport im Darm von Fischen

Ähnlich wie bei Mammaliern und Vögeln beschäftigen sich die meisten Untersuchungen über den intestinalen Transport von Aminosäuren bei Fischen mit der in-vitro Absorption neutraler Aminosäuren. Die meisten Untersuchungen wurden dabei mit der "everted-gut-sac" - Technik (WILSON und WISEMAN, 1954) durchgeführt, mit der sich ein transmuraler Transport gegen ein Konzentrationsgefälle nachweisen läßt.

Mit dieser Methode konnten ROUT et al. (1965) den aktiven Transport von D- und L-Tyrosin, sowie seiner o-, m- und p-Isomere am Darm der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*) nachweisen. Auch L-Tryptophan, nicht aber D-Tryptophan und N-Acetyltryptophan wurden im Darm der Flunder aktiv absorbiert.

Die gleichen Beobachtungen machten HUANG und ROUT (1967) am Darm des Zebrafisch (Fundulus heteroclitus). Da die Absorption der D- und L-Formen bei den höheren Wirbeltieren nur im Darm von Feten, nicht aber bei adulten Tieren bekannt war, schlossen Huang und Rout aus der fehlenden Spezifität der Transportmechanismen, daß sich der Darm von Fischen auch in dieser Hinsicht auf einer niedrigeren Evolutionsstufe befindet.

NEFF und MUSACCHIA (1967) konnten an umgestülpten Darmsäckchen von amerikanischen Zwergwelsen (Ictalurus nebulosus Les.) und Meerbrassen (Stenotomus versicolor) die Aufnahme von L-Leucin gegen ein Konzentrationsgefälle nachweisen. Das gleiche gelang SMITH (1969) für den Glycintransport im Darm von marinen Pomadaseiden (Haemulon plumieri).

Am Darm von Goldfischen (Carassius auratus L.) konnte SMITH (1970) den aktiven transmuralen Transport von insgesamt 18 verschiedenen Aminosäuren demonstrieren. Neben neutralen Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Alanin, Tyrosin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Threonin), sowie der Iminosäure Prolin wurden in diesem Versuch die basischen Aminosäuren Lysin, Histidin und Arginin gegen ein Konzentrationsgefälle in das seröse Medium umgestülpter Darmsäckchen transportiert.

An Regenbogenforellen (Salmo gairdnerii R.) wurde der aktive transepitheliale Transport von Glycin (BOG~~x~~ 1972; BOG~~x~~ et al. 1977, 1979a), L-Lysin (HOKAZONO et al., 1979), L-Alanin (MARCOTTE und DE LA NOUE, 1984) und L-Leucin (INGHAM und ARME, 1977; HABIBI und INCE, 1984) nachgewiesen.

Ähnlich wie bei Säugern ist auch bei Fischen der intestinale Transport von Aminosäuren an die Anwesenheit von Na<sup>+</sup>-Ionen gebunden.

In Fluxversuchen am isolierten Darm von Goldfischen (Carassius auratus L.) konnten SMITH und ELLORY (1971) durch Variation der Na<sup>+</sup>-Konzentration im Inkubationsmedium die Abhängigkeit des transepithelialen Alanintransportes von der extrazellulären

Na<sup>+</sup>-Konzentration aufzeigen. GARG und SASTRY (1976) und GARG (1981a) benutzten die "everted-sac-Methode", um auf die gleiche Weise die Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit der aktiven Glycin und L-Leucin-absorption im Darm von tropischen Schlangenköpfen (*Ophiocephalus punctatus*) und Luftsackwelsen (*Heteropneustes fossilis*) nachzuweisen.

BOG~~g~~ et al. (1979b) verwendeten Ouabain, einen Hemmstoff der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, zum Nachweis der Na<sup>+</sup>-Abhängigkeit des Glycin-transportes im Darm von Regenbogenforellen. In der gleichen in-vitro Untersuchung konnte auch die Notwendigkeit eines intakten Energiestoffwechsels der Zelle für den aktiven Transport von Aminosäuren nachgewiesen werden. So wurde sowohl durch 2,4 Dinитrophenol (Hemmung der oxidativen Phosphorylierung) als auch durch NaF (Hemmung der Glycolyse) eine Reduzierung der Transportraten von Glycin erreicht. Die Wirkung dieser Stoffwechsel-inhibitoren war allerdings weitaus schwächer als etwa am Darm von Säugern.

Bei Fischen wurden bisher nur wenige kinetische Analysen der Aminosäurentransportsysteme durchgeführt. READ et al. (1960) und READ (1967) konnten durch Untersuchung der Transportkinetik eine kompetitive Hemmung zwischen L-Valin und L-Serin, sowie zwischen Cycloleucin und L-Leucin im Darm von Haien (*Mustelus carnis*) nachweisen.

KITCHIN und MORRIS (1971) fanden in Untersuchungen an Goldfischen (*Carassius aureatus* L.) eine Konkurrenz von L-Valin und L-Methionin um das gleiche Transportsystem. So wurde die Aufnahme von Valin (0,02 mmol/l) in das Darmgewebe durch die Gegenwart von 5 mmol Methionin/l im Inkubationsmedium um 26 % vermindert. Dabei erhöhte sich K<sub>t</sub> für den Valintransport von 1,59 mmol/l auf 3,10 mmol/l. Valin dagegen hatte nur einen sehr geringen Effekt auf den Methionintransport.

INGHAM und ARME (1977) stellten bei ihren Untersuchungen über die Kinetik der <sup>14</sup>C-L-Leucinaufnahme in umgestülpte Darmringe von Regenbogenforellen ebenfalls eine kompetitive Hemmung zwi-

schen L-Valin, L-Methionin und L-Leucin fest. L-Leucin wurde in Anwesenheit von  $\text{Na}^+$ -Ionen durch einen saturablen, stereospezifischen Transportprozess aktiv in die Darmmucosa aufgenommen. Bei einer Inkubationstemperatur von  $10^\circ\text{C}$  geben die Autoren für den L-Leucin-Transport im Mitteldarm ein  $K_t$  von  $2,72 \text{ mmol/l}$  und ein  $V_{\text{max}}$  von  $19,61 \mu\text{mol/g}$  Darmtrockengewicht  $\times 10 \text{ min}$  an. Durch die Gegenwart von L-Methionin bzw. L-Valin im Inkubationsmedium wurde die Affinität des Carriers für Leucin deutlich herabgesetzt, wobei sich L-Methionin als der weitaus wirksamere Inhibitor erwies. So erhöhte sich  $K_t$  für den L-Leucintransport von  $2,72 \text{ mmol/l}$  auf  $13,56 (+ 10 \text{ mmol L-Methionin/l})$  bzw.  $3,84 \text{ mmol/l} (+ 10 \text{ mmol L-Valin/l})$ .

BOGŽ et al. (1979a) untersuchten die Konzentrationsabhängigkeit der Glycinaufnahme in verschiedenen Darmabschnitten von Regenbogenforellen sowohl in vitro als auch mit einer in-vivo-Perfusionsmethode. Die Autoren konnten dabei zeigen, daß die in-vitro Absorption von Glycin im Konzentrationsbereich zwischen  $0,5$  und  $10 \text{ mmol/l}$  im Mitteldarm und im Rektum von Forellen der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Sowohl  $K_t$  ( $52,461 \text{ mmol/l}$ ) als auch  $V_{\text{max}}$  ( $83,207 \mu\text{mol/g}$  Darmnaßgewicht  $\times 15 \text{ min}$ ) waren im Mitteldarm signifikant größer als im Rektum ( $K_t$ :  $10,751 \text{ mmol/l}$ ;  $V_{\text{max}}$ :  $20,865 \mu\text{mol/g}$  Darmnaßgewicht  $\times 15 \text{ min}$ ). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, daß eine "Carrier-vermittelte" aktive Absorption von Glycin bei niedrigen Konzentrationen ( $< 2 \text{ mmol/l}$ ) vorwiegend im Rektum, bei höheren Konzentrationen überwiegend im Mitteldarm stattfindet. In vivo konnte allerdings nur im Rektum eine Sättigung des Transportes innerhalb des genannten Konzentrationsbereiches festgestellt werden. Im Mitteldarm dagegen bestand zwischen der Absorptionsrate und der Glycinkonzentration im Perfusionsmedium eine lineare Abhängigkeit, was im Gegensatz zu den in-vitro Ergebnissen auf eine Absorption durch einfache Diffusion schließen läßt.

CARTIER et al. (1979) konnten in einer in-vitro Untersuchung am Darm von Schleien (*Tinca tinca* L.) mit der "intestinal-slices"-Methode (AGAR et al., 1954) zeigen, daß der Influx von Phenyl-

alanin durch die Bürstensaummembran der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Die Autoren ermittelten dabei einen  $K_t$ -Wert von 2,9 mmol/l sowie eine maximale Transportrate von 1,35  $\mu\text{mol/g}$  Darmnaßgewebe  $\times$  min.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

Die intestinale Absorption von L-Lysin wurde in vitro im Mitteldarm und Rektum von Regenbogenforellen (*S. gairdnerii* R.) bei verschiedenen Temperaturen (5°, 15°, 25°C) untersucht. Die Experimente zum transmuralen Transport von <sup>3</sup>H-markiertem L-Lysin wurden an umgestülpten Darmsäckchen (WILSON und WISEMAN, 1954) von insgesamt 84 einsömmrigen, sowie 72 zwei bis dreijährigen Forellen durchgeführt. Die Kinetik der L-Lysinabsorption durch die Bürstensaummembran der Mucosazellen wurde mit dem von SCHARRER (1978) beschriebenen in-vitro Modell an insgesamt 108 adulten Regenbogenforellen untersucht.

#### 3.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Zur Durchführung der Experimente wurden nur Regenbogenforellen ohne äußerlich erkennbare Erkrankungen verwendet, die mindestens 14 Tage lang an die später genannten Haltungsbedingungen adaptiert waren. Das Geschlecht der Tiere wurde bei der Auswahl nicht berücksichtigt.

Alle Versuche wurden in der Isotopenabteilung des Institutes durchgeführt. Die vorgesehenen Fische (jeweils 6 - 8), die 24h nicht gefüttert worden waren, wurden am Morgen des jeweiligen Versuchstages in wassergefüllten PVC-Transportsäcken von den Außenanlagen des Institutes (Oberwiesenfeld) zum Labor transportiert (Transportdauer 15 - 20 min). Für die Dauer der Versuchsdurchführung (ca. 2 - 3 Stunden) wurden die Forellen in ca. 50 l fassenden Steinbecken unter fließendem Leitungswasser und zusätzlicher Diffusionsbelüftung gehalten. Negative Auswirkungen des relativ kurzen Transportes und der kurzfristig geänderten Haltungsbedingungen waren auf Grund der gleichbleibenden Temperaturen des Leitungswassers und ausreichender Sauerstoffversorgung nicht zu erwarten. Dennoch erkennbar geschädigte Tiere wurden vor Versuchsbeginn eliminiert.

### 3.1.1 Versuche zum transmuralen Lysin-Transport

Die Versuche zum transmuralen Lysintransport wurden an Regenbogenforellen zweier verschiedener Gewichts- bzw. Altersklassen durchgeführt. Zwei bis drei Jahre alte Fische mit einem Durchschnittsgewicht von  $432 \pm 41$  g wurden von einer Forellenzucht in der Nähe Münchens (VON FINCK & WINTERSTEIN, Aumühle) bezogen. Die Jungfische mit einer Stückmasse von  $71 \pm 13$  g wurden als überzählige Tiere aus der institutseigenen Aufzucht übernommen.

Nach dem Ankauf bzw. dem Umsetzen wurden alle Fische zunächst in den Außenanlagen des Institutes (ca. 1500 l fassende Kunststoffrinnen) gehalten. Während der durchschnittlich zweiwöchigen Vorhälterung wurde eine Angleichung der Haltungs- und Fütterungsbedingungen erreicht und die Selektion erkrankter Tiere ermöglicht. Die Dauer der Vorperiode richtete sich dabei nach der Futteraufnahme, wobei ein täglicher Verzehr von ca. 1% der Lebendmasse angestrebt wurde.

Die Halterbecken wurden kontinuierlich mit Leitungswasser durchströmt und zusätzlich über eine Diffusionsanlage belüftet. Die Durchflußmenge wurde der jeweiligen Besatzdichte angepaßt. Dabei wurde darauf geachtet, daß ein Sauerstoffgehalt von 9,5 ppm bzw. 90% Sättigung nicht unterschritten wurde. Gelegentlich im Leitungswasser auftretendes Chlor (Chlorierung durch Wasserwerke) wurde durch Aktivkohlefilter entfernt. Die Wassertemperatur lag während des Versuchszeitraumes (November - Februar) zwischen 8,0 und 10,5°C.

Während der gesamten Halterungsdauer wurde zweimal täglich ein pelletiertes Alleinfuttermittel angeboten. An die adulten Tiere wurden 8 mm-Pellets (35% Rohprotein, 18% Fett, 1,6% Calcium und 1,0 % Phosphor), an die Jungfische 3 mm-Pellets (45% Rohprotein, 16% Fett, 1,4 % Calcium und 0,9 % Phosphor) verfüttert.

### 3.1.2 Versuche zur Kinetik der Lysinabsorption

Die Kinetik der intestinalen Lysinaufnahme wurde an adulten Regenbogenforellen ( $435 \pm 98$  g Lebendmasse; 2 bis 3 Jahre alt) untersucht, die zum größten Teil von der vorgenannten Forellenzucht angekauft wurden. Teilweise wurden aber auch überzählige Tiere aus anderen Versuchen verwendet, so daß das Tiermaterial bei diesen Untersuchungen nach Herkunft und Gewicht sehr unterschiedlich war.

Die Hälterung der Fische erfolgte in 500 l fassenden PVC-Rundbecken im Tierstall des Institutes unter Tageslichtbedingungen. Die Temperatur in den Becken schwankte im Versuchszeitraum zwischen 10,0 und 12,5°C. Ansonsten entsprachen Haltung und Fütterung den unter 3.1.1 für die adulten Tiere genannten Kriterien.

### 3.2 Chemikalien

Alle zur Herstellung des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers verwendeten Mineralsalze, sowie Polyethylenglykol (PEG, MG: 4000) wurden von der Fa. MERCK, Darmstadt bezogen. L-Lysin-HCl stammte von der Fa. SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg. Zur Hemmung der intrazellulären Lysinaufnahme wurden 2,4 Dinitrophenol (kristallin 90 - 95%) und Ouabain (G-Strophanthin) der Fa. SIGMA CHEMIE, Taufkirchen benutzt. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien in der Reinheitsstufe p.A. verwendet.

4,5-  $^3\text{H}$ -Lysinmonohydrochlorid (spezifische Aktivität: 2,7 - 3,7 TBq/mmol), sowie das zur Markierung des Extrazellulär-raumes verwendete  $^{14}\text{C}$ -Polyethylenglykol 4000 (spez. Aktivität: 2,7 - 3,7 TBq/mmol) stammten von AMERSHAM BUCHELER, Braunschweig.

### 3.2.1 Pufferlösung

Alle Versuchslösungen wurden auf der Basis des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers (KHB) hergestellt. Einzelheiten der Zusammensetzung sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers (KREBS und HENSELEIT, 1932)

| KREBS-HENSELEIT-BICARBONAT-PUFFER*                                                                                              |              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| NaCl                                                                                                                            | 118,5 mmol/l |
| KCl                                                                                                                             | 4,7 mmol/l   |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                                                                                           | 2,5 mmol/l   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                                                                                 | 1,2 mmol/l   |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                                                                                           | 1,2 mmol/l   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                                                                                              | 24,8 mmol/l  |
| * Der Puffer wurde vor Gebrauch 20 min mit Carbogen (O <sub>2</sub> :CO <sub>2</sub> = 95:5) begast und auf pH 7,4 eingestellt. |              |

### 3.3 Zusammensetzung der Versuchslösungen

Als Inkubationsmedium bei den Darmsäckchenversuchen (transmuraler Lysintransport) wurden 0,5 bzw. 1,0 mM L-Lysinlösungen verwendet, die gleichbleibend mit 0,5 MBq <sup>3</sup>H-Lysin/l markiert wurden.

Die Kinetik der intrazellulären Lysinaufnahme wurde mit der von SCHARRER (1978) beschriebenen in-vitro Methode im Bereich von 0,05 - 2,0 mmol/l untersucht. Als nicht absorbierbarer Marker für den Extrazellulärraum wurde den Versuchslösungen Polyethylenglykol (PEG, MG: 4000) in einer Konzentration von 0,02 mmol/l beigegeben. Bei den Studien zur Energetisierung des intestinalen Lysin-Transportes wurden die Stoffwechsellinhibitoren Ouabain (G-Strophantin: 1 mmol/l) bzw. 2,4 Dinitrophenol (2,4 DNP: 1 mmol/l) zu einer 0,1 mM L-Lysinlösung zugesetzt.

Die Staffelung der Lysinkonzentration, sowie weitere Einzelheiten der Zusammensetzung sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

| Tabelle 3: Versuchslösungen zur Untersuchung des L-Lysin-transportes durch die Bürstensaummembran der Mucosazellen; alle Angaben in mmol/l. |      |      |      |      |      |      |      |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| L-LYSIN*                                                                                                                                    | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,30 | 0,40 | 0,50 | 1,00 | 2,00 |
| PEG 4000*                                                                                                                                   | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| OUBAIN                                                                                                                                      | --   | 1,00 | --   | --   | --   | --   | --   | --   |
| 2,4 DNP                                                                                                                                     | --   | 1,00 | --   | --   | --   | --   | --   | --   |

\* Markierung: jeweils 0,5 MBq  $^3\text{H}$ -L-Lysin und  $^{14}\text{C}$ -PEG 4000/l der fertigen Versuchslösung.

### 3.4 Versuchstechnik

Die Kürze des Darmes, dessen Länge in etwa der Körperlänge entspricht (EZEASOR, 1978), sowie der Besitz eines Magens machen die Regenbogenforelle zu einem typischen Vertreter der vorwiegend carnivoren "Raubfische" unter den Nutzfischen.

Im Anschluß an den U-förmigen Magen lassen sich an dem ohne weitere Windungen in der Bauchhöhle liegendem Rumpfdarm makroskopisch insgesamt 3 Abschnitte unterscheiden: der aufsteigende, proximale Teil des Mitteldarmes, der die Pylorusanhänge trägt, das mittlere absteigende Segment des Mitteldarms, sowie das terminale, erweiterte Rektum (BULLOCK, 1963; EZEASOR und STOKOE, 1981). Die Grenze zwischen Mitteldarm und Rektum wird durch eine hohe Schleimhautfalte, die Ileo-Rektal-Falte markiert (EZEASOR und STOKOE, 1980). Eine weitere Unterteilung des Mitteldarmes in gesonderte Abschnitte wie beim Säuger ist weder nach der Topographie noch nach der histologischen Struktur möglich (SCHUBERT, 1979).

In der vorliegenden Arbeit wird der Darmabschnitt zwischen letztem Pylorusanhang und der Ileo-Rektal-Falte als Mitteldarm, das darauf folgende erweiterte und dunkler pigmentierte Darmsegment als Rektum bezeichnet.

#### 3.4.1 Präparation des Darmes

Unmittelbar nach der Tötung des Versuchstieres durch einen Schlag auf den Kopf und anschließender Durchtrennung des Rückenmarkes wurde die Bauchhöhle in der Medianen eröffnet und der gesamte Darm stumpf präpariert. Der Rumpfdarm zwischen letztem Pylorusanhang und Anus wurde exzidiert und sofort in eiskaltem Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHB) gespült. Das anhängende Darmfett, sowie eventuell noch vorhandener Darminhalt wurden sorgfältig entfernt und der Darm an der Ileo-Rektal-Falte durchtrennt. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die beiden Darmteile in eiskaltem KHB-Puffer unter Carbogenbegasung aufbewahrt.

#### 3.4.2 Transmuraler Lysin-Transport

Mit dem von WILSON und WISEMAN (1954) beschriebenen in-vitro Transportmodell läßt sich an umgestülpten Darmsäckchen ein Substrattransport durch die Darmwand gegen einen Konzentrationsgradienten nachweisen.

Die exzidierten (vgl. 3.4.1) Darmabschnitte wurden über einen Plastikkatheter (Hundeharnkatheter) gewendet, so daß die mucöse Seite nach außen, die seröse Seite nach innen gerichtet war. Die gewendeten Darmabschnitte wurden zunächst an ihrem proximalen Ende mit chirurgischer Nähseide abgebunden. Die so entstandenen Säckchen wurden vom distalen Ende aus über eine Knopfkanüle, auf die eine 2 ml Rekordspritze aufgesetzt war, mit 0,5 - 1,0 ml (Mitteldarm) bzw. 1,5 - 2,0 ml (Rektum) der Versuchslösung bis zur mäßigen Spreizung der Darmzotten gefüllt. Dabei wurde die Kanüle so zwischen Daumen und Zeige-

finger fixiert, daß keine Versuchslösung austreten konnte. Nach Erreichen des gewünschten Füllungszustandes wurde auch das bis dahin noch offene distale Darmende ligiert. Der Inhalt des Säckchens wird nachfolgend als seröses Medium bezeichnet.

Anschließend wurde die Länge des Darmteiles zwischen den Ligaturen gemessen, das gefüllte Säckchen gewogen und in einen 50ml Erlenmeyerkolben verbracht, der jeweils 20 ml der Versuchslösung (mucöses Medium) enthielt. Sowohl seröses als auch mucöses Medium wurden vor Versuchsbeginn in einem Wasserbad auf die beabsichtigte Versuchstemperatur eingestellt und waren zu Beginn der Inkubation identisch.

Nach einer kurzen Begasung mit Carbogen ( $O_2:CO_2 = 95 : 5$ ) wurde der Kolben luftdicht verschlossen und 60 bzw. 120 min in einem temperierten (5, 15 bzw. 25°C) Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurden die Kolben mit 120 Oszillationen/min geschüttelt um die Bildung einer "unverrührten Schicht" zu vermeiden.

Nach Ablauf der Inkubation wurden die Säckchen aus den Erlenmeyerkolben entnommen, leicht auf Zellstoffwatte abgetupft und erneut gewogen. Danach wurde der Inhalt des Säckchens über eine Inzisur am distalen Ende vollständig in ein 10ml Bechergläschen entleert. Der zwischen den Ligaturen liegende Darmteil, der folglich an der Absorption beteiligt war, wurde zur Bestimmung des Darmtrockengewichtes 24h bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Bestimmung der  $^3H$ -Aktivität der Proben wurde im Anschluß an die Inkubation jeweils ein Aliquot (500  $\mu$ l) des serösen bzw. mucösen Mediums entnommen, mit der gleichen Menge 0,65 M Perchlorsäure enteiweißt und 10 min lang bei 4000 U/min zentrifugiert.

Jeweils 200  $\mu$ l des klaren Überstandes wurden zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (QUICKSZINT 212, ZINSSER) in ein 20ml Zählfläschchen (ZINSSER) pipettiert. Die Aktivität der Proben

wurde anschließend als Impulsrate (IPM/min) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (PACKARD TRI-CARB, MOD. 4530) gegenüber einem Leerwert (200 µl der verwendeten Perchlorsäure) gemessen. Eine Quenchkorrektur wurde nach externer Standardisierung automatisch vorgenommen.

Die Aktivität (IPM/min) der als Bezugsgröße bei der Berechnung verwendeten, nicht inkubierten Versuchslösung wurde in gleicher Weise bestimmt.

### 3.4.2.1 Versuchsauswertung

Als Bezugsgröße bei der Berechnung der L-Lysinkonzentration des serösen und mucösen Mediums diente die  $^3\text{H}$ -Aktivität der Versuchslösung bekannter Molarität. Da der Anteil des radioaktiv markierten Lysins am Gesamtlysin bei homogener Verteilung konstant ist, kann die Lysinkonzentration aus der Aktivität der Proben nach folgender Formel berechnet werden:

$$[\text{LYS}]_{s(m)} = \frac{{}^3\text{H-Akt.} - s(m)}{{}^3\text{H-Akt.} - \text{Vlsg.}} \times [\text{LYS}]_{\text{Vlsg.}}$$

$[\text{LYS}]_{s(m)}$ : Endkonzentration von Lysin im serösen (S) bzw. mucösen (M) Medium, (mmol/l).

$[\text{LYS}]_{\text{Vlsg.}}$ : Ausgangskonz. der Versuchslösung, (mmol/l).

${}^3\text{H-Akt.} - s(m)$ :  ${}^3\text{H}$ -Zählrate des serösen (mucösen) Mediums nach der Inkubation, (Impulse/min x ml).

${}^3\text{H-Akt.} - \text{Vlsg.}$ :  ${}^3\text{H}$ -Zählrate der Versuchslösung, (Imp./min x ml).

Als Transportparameter wurden die während der Inkubation zwischen dem serösen (S) und mucösen (M) Medium zustande gekommenen Konzentrationsgradienten (S/M), sowie die gegen ein Konzentrationsgefälle erfolgte Mengenzunahme von Lysin im serösen Medium ("seröser Transfer") herangezogen. Da die Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium zu Beginn der Inkubation identisch ist, können Quotienten  $S/M > 1$  als Zeichen eines aktiven transmuralen Lysintransportes gegen ein Konzentrationsgefälle gewertet werden.

Die Substrataufnahme in die Darmsäckchen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s.T. = \frac{[LYS]_s \times (Vol + G_2 - G_1) - [LYS]_{v1.9} \times Vol}{DTG}$$

s. T.: seröser Lysintransfer,  $\mu\text{mol/g}$  Darmtrockengewicht.

$[LYS]_{v1.9}$ : Lysinkonzentration in der Versuchslösung,  $\text{mmol/l}$ .

Vol: Einfüllvolumen (serös),  $\text{ml}$ .

$[LYS]_s$ : Lysinkonzentration des serösen Mediums nach der Inkubation,  $\text{mmol/l}$ .

$G_1$ : Gewicht des gefüllten Darmsäckchens vor der Inkubation,  $\text{g}$ .

$G_2$ : Gewicht des gefüllten Darmsäckchens nach der Inkubation,  $\text{g}$ .

DTG: Darmtrockengewicht,  $\text{g}$ .

### 3.4.3 Chromatographie

Zur Bestimmung der  $^3\text{H}$ -Lysin-Bindung wurden Stichproben der verwendeten Versuchslösungen, sowie des inkubierten serösen bzw. mucösen Mediums papierchromatographisch überprüft. Dazu wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Probe auf die markierte Startlinie eines Papierstreifens (Whatman No 1, 5 x 50 cm) aufgetragen. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus n-Butanol, Pyridin, Essigsäure und Aqua dest. (15 : 10 : 3 : 1) verwendet. Um eine ausreichende Trennung durch die absteigende Chromatographie zu ermöglichen, wurde die Laufmittelstrecke auf 40 cm festgelegt. Der  $R_f$ -Wert von Lysin wurde anhand von parallel dazu erstellten Chromatogrammen einer 1 mM L-Lysin-Lösung (unmarkiertes Lysin-HCl in KHB) ermittelt, die mit Ninhydrin-Spray (MERCK, Darmstadt) angefärbt wurden.

### 3.4.4 Kinetik der Lysinabsorption

Das von SCHARRER (1978) beschriebene einfache in-vitro Transportmodell ermöglicht die getrennte Untersuchung von Transportprozessen an der Bürstensaummembran der Mucosazellen. Gegenüber ähnlichen Modellen wie der "intestinal-slices" - Methode (AGAR et al., 1954; SCHACHTER et al., 1960) hat diese Technik den Vorteil, daß eine Substrataufnahme über die Serosaseite des Präparates ausgeschlossen werden kann.

Nach der Präparation des gesamten Rumpfdarmes (vgl. 3.4.1) wurde dieser zunächst der Länge nach aufgeschnitten, sorgfältig in eiskaltem Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer gespült und in Mitteldarm und Rektum geteilt. Beide Darmabschnitte wurden anschließend mit einer Schere in jeweils 4 aufeinanderfolgende, ca. 2 cm lange Segmente zerteilt. Jedes dieser Darmstücke wurde anschließend so über einen Plastikstöpsel (Meßkolbenverschluß: 0,465  $\text{cm}^2$  Auflagefläche) gespannt, daß später nur die mucöse Seite mit dem Inkubationsmedium in Kontakt kommen konnte. Die Spannung (bis zum Verstreichen der Mucosafalten) und Fixierung

der Präparate erfolgte durch einen Gummiring, der genau in eine unterhalb der Stöpselspitze eingefräste Rinne paßte.

Die an einem Faden befestigten Präparate wurden anschließend in 80 ml Zentrifugengläser eingehängt, die jeweils 20 ml des Inkubationsmediums enthielten. Die Gläser wurde mit Carbogen ( $O_2 : CO_2 = 95 : 5$ ) gefüllt, mit einem Gummistöpsel gasdicht verschlossen und anschließend 15 min lang in Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer vorinkubiert. Die Vorinkubation erfolgte ebenso wie die anschließende Hauptinkubation in einem temperierten ( $5^\circ$ ,  $15^\circ$  bzw.  $25^\circ C$ ) Wasserbad. Während der Inkubation wurden die Präparate mit einer Frequenz von 180 Oszillationen/min geschüttelt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit (15 min) wurden die Stöpsel aus den Zentrifugengläsern entnommen und kurz in eiskalten KHB getaucht. Anschließend wurde das von einem Gummiring umschlossene Gewebe exzidiert und in einen mit gebleichter Zellstoffwatte gefüllten Oxidizer-Cup (PACKARD) verbracht.

#### 3.4.4.1 Versuchsauswertung

Zur Messung der  $^3H$ - bzw.  $^{14}C$ -Aktivität wurden die inkubierten Gewebestücke sowie ein Aliquot der Versuchslösung (200  $\mu l$ ) in einem Packard Sample Oxidizer (Mod.: B 306) verbrannt. Durch die Verbrennung wurde eine automatische Trennung der  $^3H$ -( $H_2O$ ) von der  $^{14}C$ -( $CO_2$ )-Aktivität der Proben ermöglicht.

Bei der Verbrennung wurde Lumasorb (BAKER, Groß-Gerau) als  $CO_2$ -Absorber benutzt. Carboluma und Oxiluma (BAKER) wurden als Szintillationsflüssigkeiten zur Messung der  $^3H$ - bzw.  $^{14}C$ -Aktivität der Proben im Flüssigkeitsszintillationszähler (PACKARD TRI-CARB MOD.: 4530) verwendet. Eine Quenchkorrektur wurde nach externer Standardisierung automatisch durch den Zähler vorgenommen.

Der Zusatz von  $^{14}\text{C}$  - markiertem Polyethylenglykol zum Inkubationsmedium ermöglichte die Korrektur der  $^3\text{H}$ -Lysinaufnahme um die im Extrazellulärraum verbliebene Aminosäurenmenge. Als Berechnungsgrundlage diente die  $(^3\text{H}/^{14}\text{C})$ -Aktivität der Versuchslösungen bekannter Molarität. Alle berechneten Werte wurden dabei auf die Größe der serösen Auflagefläche bezogen.

Die intrazelluläre L-Lysinaufnahme kann nach Korrektur um den im Extrazellulärraum verbliebenen  $^3\text{H}$ -Lysin-Anteil aus der Aktivität der Versuchslösung berechnet werden:

$$\text{IA} = \frac{(^3\text{H-Probe} - ^{14}\text{C-Probe} \times F) \times [\text{LYS}]_{\text{v1sg}}}{^3\text{H-V1sg} \times 0,465 \times 1000 \times 15 \text{ min}}$$

IA: Intrazelluläre Lysinaufnahme,  $\text{nmol}/\text{cm}^2 \times 15 \text{ min}$ .

[LYS]<sub>v1sg</sub>: Lysinkonzentration der Versuchslösung,  $\text{mmol}/\text{l}$ .

$^3\text{H-Probe}$ :  $^3\text{H}$ -(Lysin)-Aktivität der Probe,  $\text{Impulse}/\text{min}$ .

$^{14}\text{C-Probe}$ :  $^{14}\text{C}$ -(PEG)-Aktivität der Probe,  $\text{Impulse}/\text{min}$

$^3\text{H-V1sg}$ :  $^3\text{H}$ -Lys- Aktivität der Versuchslösung bekannter Molarität,  $\text{Impulse}/\text{min} \times \text{ml}$ .

$$F = \frac{^3\text{H-Aktivität der Versuchslösung (Imp./min} \times \text{ml)}}{^{14}\text{C-Aktivität der Versuchslösung (Imp./min} \times \text{ml)}}$$

### 3.5 Statistik

Alle Daten werden als Gruppenmittelwerte mit Standardabweichung wiedergegeben. Die Prüfung auf Signifikanz der Gruppenunterschiede erfolgte mit dem parameterfreien U-Test nach WILCOXON, MANN und WHITNEY (SACHS, 1974) für zwei unabhängige Stichproben. Dort wo mehrere Gruppen miteinander verglichen werden mußten, wurde zunächst mit dem H-Test von KRUSKAL und WALLIS (SACHS, 1974) für mehrere unabhängige Stichproben auf das Vorliegen signifikanter Unterschiede geprüft. Anschließend wurden die Unterschiede dann mit dem U-Test überprüft. Das Signifikanzniveau wurde vorher auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Die kinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  wurden nach reziproker Transformation (LINEWEAVER und BURK, 1934) der gemessenen Absorptionsraten aus den Achsenabschnitten des Lineweaver-Burk-Diagrammes ermittelt, die aus der Regressionsgleichung der linearisierten Daten berechnet wurden.

Die Gleichungen der Regressionsgeraden wurden nach dem Prinzip der "kleinsten Quadrate" ermittelt und anhand des Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) geprüft. Die Anpassung der graphischen Darstellungen an nichtlineare Beobachtungen erfolgte durch Berechnung der Ausgleichsparabeln  $y = a + b_1x + b_2x^2$  (SACHS, 1982).

#### 4. VERSUCHSERGEBNISSE

##### 4.1 Transmuraler Transport von $^3\text{H}$ -L-Lysin

Der Transport von  $^3\text{H}$ -markiertem L-Lysin durch die Darmwand wurde sowohl an Jungfischen (Gruppe A), als auch an adulten Regenbogenforellen (Gruppe B) bei Inkubationstemperaturen von  $5^\circ$ ,  $15^\circ$  und  $25^\circ\text{C}$  untersucht. Umgestülpte Darmsäckchen von Mitteldarm und Rektum, die mit 0,5 bzw. 1,0 mM Lysinlösungen gefüllt waren (seröses Medium), wurden bei jeder der 3 Temperaturen jeweils 60 und 120 min lang in der gleichen Lösung (mucöses Medium) inkubiert. Seröses und mucöses Medium waren zu Beginn der Inkubation identisch.

Als Transportparameter dienten die während der Inkubation eingetretenen Konzentrationsänderungen im serösen und mucösen Medium. In Fällen, in denen auf der Serosaseite ein signifikanter ( $p < 0,05$ ) Konzentrationsanstieg über die Ausgangskonzentration hinaus gemessen werden konnte, wurde die gegen ein Konzentrationsgefälle in das seröse Medium aufgenommene Substratmenge als seröser Transfer (s.T. [ $\mu\text{mol/g}$  Darmtrockengewicht]) berechnet.

##### 4.1.1 Zuverlässigkeit der $^3\text{H}$ -Markierung

Die Bindung der  $^3\text{H}$ -Aktivität an Lysin wurde durch papierchromatographische Untersuchungen von Stichproben des inkubierten serösen und mucösen Mediums überprüft. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Die  $^3\text{H}$ -Aktivität der nicht inkubierten Versuchslösung war in Versuch A zu 87 %, in Versuch B zu 94 % an die Aminosäure gebunden. Bei der Restaktivität, die sich gleichmäßig über das Chromatogramm verteilte, handelt es sich sehr wahrscheinlich um  $^3\text{H}_2\text{O}$ , das als Folge einer Dekompensation in wässrigen  $^3\text{H}$ -Substratlösungen auftritt.

Tabelle 4: Bindung der  $^3\text{H}$ -Aktivität an L-Lysin im serösen (S) und mucösen (M) Medium umgestülpter Darmsäckchen nach einer Inkubation von 120 min bei 25°C; alle Angaben in % der Gesamtaktivität der Probe.

| $^3\text{H}$ - BINDUNG AN L-LYSIN (%) |                |            |      |        |      |
|---------------------------------------|----------------|------------|------|--------|------|
| VERSUCHSGRUPPE                        | VERSUCHSLÖSUNG | MITTELDARM |      | REKTUM |      |
|                                       | 1,0 mmol Lys/l | S          | M    | S      | M    |
| A                                     | 86,7           | 80,1       | 86,2 | 82,6   | 87,4 |
| B                                     | 94,4           | 92,3       | 95,6 | 90,6   | 89,9 |

Die Unterschiede in der Markierung der Versuchslösungen lassen sich somit auf die Verwendung zweier unterschiedlicher  $^3\text{H}$ -L-Lysinchargen zurückführen. In Versuch A wurde älteres Material aus Institutsbeständen verbraucht, während die in Versuch B verwendete Charge unmittelbar vorher vom Hersteller (Amersham Buchler) bezogen worden war.

Der Prozentsatz der  $^3\text{H}$ -Lysin-Bindung änderte sich im Verlauf der zweistündigen Inkubation bei 25°C weder im serösen noch im mucösen Medium wesentlich. Damit konnte die Zuverlässigkeit der radioaktiven Markierung, welche die Berechnungsgrundlage für die weiteren Versuche bildete, sichergestellt werden.

Die Stabilität der Markierung während der Inkubation, sowie das Fehlen weiterer Aktivitätsspitzen auf den Chromatogrammen lassen darauf schließen, daß Lysin beim Transport durch die Darmwand nur in sehr geringem Umfang verstoffwechselt wird. Aus den Werten in Tabelle 4 ergibt sich eine Wiederfindungsrate (seröses Medium : Inkubationslösung) zwischen 92 und 98 %.

#### 4.1.2 Lysin-Transport im Darm junger Forellen (Versuch A)

Die Untersuchungen wurden an umgestülpten Darmsegmenten (Mitteldarm, Rektum) von insgesamt 84 Regenbogenforellen mit einer mittleren Lebendmasse von  $71,3 \pm 12,6$  g durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Weitere Einzelheiten sind den Tabellen A1 - A4 im Anhang zu entnehmen.

##### 4.1.2.1 Einfluß der Inkubationsdauer

Die everted-gut-sac-Methode (WILSON und WISEMAN, 1954) ist zwar ein technisch sehr einfach zu handhabendes in-vitro Transportmodell, erfordert aber meist relativ lange Inkubationszeiten (MEPHAM und SMITH, 1966a,b). Nur der erste Transportschritt, die Aufnahme des Substrates durch die Bürstensaummembran (BSM) erfolgt durch aktiven Transport. Die anschließende Füllung der subepithelialen Gewebe erfolgt dagegen wesentlich langsamer durch Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. In Abhängigkeit von der Transportrate durch die BSM, sowie der Schichtdicke und Durchlässigkeit der darunterliegenden Darmwandschichten sind Änderungen der Substratkonzentration im serösen Medium, insbesondere bei niedrigen Temperaturen, immer erst mit einer mehr oder weniger großen Zeitverzögerung feststellbar (KITCHIN und MORRIS, 1971).

Auch in der vorliegenden Untersuchung konnte nach einer Inkubationsdauer von 60 min bei niedrigen Temperaturen ( $5^{\circ}, 15^{\circ}$  C) kein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration im serösen Medium über die Ausgangskonzentration hinaus beobachtet werden (Tabelle 5, A1 u. A2).

**Tabelle 5: TRANSMURALER LYSIN-TRANSPORT IM DARM JUVENILER  
REGENBOGENFORELLEN**

| INKUBATION: 60 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol/l   |            |            |             |
|----------------------------------------------------------|------------|------------|-------------|
| TEMPERATUR<br>Tierzahl (n)                               | 5°C<br>6   | 15°C<br>9  | 25°C<br>7   |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)   | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,47 ±0,01 | 0,60 ±0,04 | 0,68 ±0,02* |
| Rektum                                                   | 0,44 ±0,01 | 0,48 ±0,02 | 0,48 ±0,04  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | ----       | 2,88 ±1,34  |
| Rektum                                                   | ----       | ----       | ----        |
| INKUBATION: 60 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol/l   |            |            |             |
| Tierzahl (n)                                             | 6          | 9          | 7           |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)   | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,99 ±0,06 | 1,08 ±0,08 | 1,25 ±0,10* |
| Rektum                                                   | 0,94 ±0,03 | 0,91 ±0,04 | 0,89 ±0,05  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | ----       | 4,90 ±1,02  |
| Rektum                                                   | ----       | ----       | ----        |
| * : signifikanter Anstieg der serösen Lysinkonzentration |            |            |             |

Lediglich bei 25° C, einer Temperatur, die allerdings über der Vorzugstemperatur der Forellen (14-16°C) liegt, konnte bei beiden untersuchten Konzentrationsstufen (0,5 u. 1,0 mM) im serösen Medium der umgestülpten Mitteldarmsegmente ein signifikanter ( $p < 0,001$ ) Konzentrationsanstieg gegenüber dem mucösen Medium festgestellt werden (Tab. 5, A1, A2). Die Konzentrationsgradienten (s/m) von 1,36 (0,5 mM) bzw. 1,34 (1,0 mM) können als Hinweis auf einen aktiven transmuralen Lysintransport im Mitteldarm gewertet werden.

Auf der serösen Seite des gleichermaßen behandelten Rektums konnte dagegen in keinem Fall ein Anstieg der Lysinkonzentration beobachtet werden.

Da der Nachweis des Lysintransportes bei niedrigen Temperaturen offensichtlich längere Inkubationszeiten erfordert, wurden die Darmpräparate in den nachfolgenden Experimenten 120 min lang inkubiert. Bei der weiteren Beschreibung der Versuchsergebnisse wird lediglich auf die Ergebnisse der zweistündigen Inkubation (Tab. 6, A3, A4) näher eingegangen.

#### 4.1.2.2 Einfluß von Temperatur und Substratkonzentration des Inkubationsmediums

Nach zweistündiger Inkubation konnte im serösen Medium umgestülpter Mitteldarmsegmente sowohl bei 25° als auch bei 15°C ein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration über das Ausgangsniveau (0,5 bzw. 1,0 mmol/l) hinaus festgestellt werden (Tab. 6). Die Konzentrationsgradienten (s/m) von 1,69 (15°C) und 2,08 (25°C) bei einer Ausgangskonzentration von 0,5 mmol/l bzw. 1,29 (15°C) und 1,54 (25°C) bei einer Lysinkonzentration von 1,0 mmol/l (Tab. A3, A4) belegen einen aktiven, von der mucösen zur serösen Seite gerichteten L-Lysintransport im Mitteldarm junger Forellen.

Auch im Rektum konnten Konzentrationsgradienten  $s/m > 1$  bei 15° und 25°C festgestellt werden. Bei einer Lysinkonzentration von 0,5 mmol/l lassen sich Gradienten von 1,17 (15°) bzw. 1,21 (25°) berechnen. Bei höherer Ausgangskonzentration (1,0 mmol/l) wurden Gradienten von 1,08 (15°) und 1,21 (25°) gemessen (Tab. A3, A4).

In keinem dieser Fälle konnte jedoch ein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration über die Ausgangskonzentration hinaus beobachtet werden, der kennzeichnend für einen aktiven Substrattransport gegen ein Konzentrationsgefälle ist.

**Tabelle 6: TRANSMURALER LYSIN-TRANSPORT IM DARM JUVENILER  
REGENBOGENFORELLEN**

| INKUBATION: 120 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol/l  |            |             |             |
|----------------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| TEMPERATUR<br>Tierzahl (n)                               | 5°C<br>6   | 15°C<br>8   | 25°C<br>8   |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)    | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,46 ±0,03 | 0,77 ±0,01* | 1,02 ±0,11* |
| Rektum                                                   | 0,43 ±0,01 | 0,52 ±0,09  | 0,56 ±0,08  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG  | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | 5,59 ±1,31  | 11,44 ±2,45 |
| Rektum                                                   | ----       | ----        | ----        |
| INKUBATION: 120 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol/l  |            |             |             |
| Tierzahl (n)                                             | 6          | 7           | 6           |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)    | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,86 ±0,05 | 1,35 ±0,12* | 1,58 ±0,13* |
| Rektum                                                   | 0,80 ±0,05 | 1,00 ±0,09  | 1,01 ±0,13  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG  | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | 7,84 ±2,50  | 14,34 ±4,44 |
| Rektum                                                   | ----       | ----        | ----        |
| * : signifikanter Anstieg der serösen Lysinkonzentration |            |             |             |

Im mucösen Medium änderte sich dagegen die Lysinkonzentration praktisch nicht. Dies ist allerdings leicht verständlich, da das Volumen und damit auch die Substratmenge auf der mucösen Seite 40 mal größer war als im serösen Inneren des Säckchens (0,5 ml).

Als weiterer Transportparameter wurde der "seröse Transfer", das heißt die gegen ein Konzentrationsgefälle aktiv in das seröse Medium der umgestülpten Darmsäckchen aufgenommene Substratmenge berechnet. Die Art der Versuchsanlage (gleiche Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium zu Inkuba-

tionsbeginn) läßt es nur sinnvoll erscheinen, den serösen Transfer bei einem signifikanten Anstieg der Endkonzentration des Substrates über die Ausgangskonzentration hinaus zu berechnen.

Ein solcher Nettotransfer von L-Lysin zur serösen Seite konnte demnach nur im Mitteldarmabschnitt bei 15°C und 25°C festgestellt werden (Tab. 6, A3 - A4).

Bei einer Ausgangskonzentration von 0,5 mmol/l verdoppelte eine Temperaturerhöhung um 10°C (von 15 auf 25°C) den serösen Transfer von 5,59 auf 11,44  $\mu\text{mol/g}$  Darmtrockengewicht (DTG)  $\times$  120min ( $p < 0,01$ ). Der gleiche Temperatureffekt konnte auch bei höherer Lysinkonzentration (1,0 mmol/l) beobachtet werden. Der seröse Transfer stieg dabei um das 1,8fache von 7,84 (15°C) auf 14,34  $\mu\text{mol/g}$  DTG  $\times$  120 min ( $p < 0,01$ ).

Im Gegensatz dazu hatte die Erhöhung der Lysinkonzentration von 0,5 auf 1,0 mmol/l nicht die erwartete Verdopplung der Transportrate zur Folge. So wurde bei 15°C lediglich eine nicht signifikante Steigerung um das 1,4fache von 5,59 (0,5 mM) auf 7,84  $\mu\text{mol/g}$  DTG  $\times$  120 min (1,0 mM) festgestellt. Bei einer Inkubationstemperatur von 25°C wurde die Transportrate ebenfalls nicht signifikant um den Faktor 1,4 von 11,44 (0,5mM) auf 14,34  $\mu\text{mol/g}$  DTG  $\times$  120 min gesteigert, was als Hinweis auf eine mögliche Sättigung des Transportsystems im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 1,0 mmol/l bewertet werden kann.

Bei der niedrigsten Inkubationstemperatur (5°C) lagen die Lysinkonzentrationen im serösen Medium signifikant ( $p < 0,05$ ) unter denen des mucösen Mediums (Tab. A3, A4). Die Abnahme der Endkonzentration im serösen Medium wurde dabei im Zusammenhang mit zum Teil extremen Gewichtszunahmen der Darmsäckchen während der Inkubation beobachtet. Diese Gewichtsänderungen sind bei der angewandten everted-gut-sac Methode auf Wasserfluxe zurückzuführen (BOG~~x~~ et al., 1978; PETTRICH, 1982).

BOG~~x~~ et al. (1978) konnten nach einer 30minütigen Inkubation bei 20°C eine Nettowasseraufnahme in umgestülpte Darmsäckchen von 200 g schweren Regenbogenforellen feststellen. Unabhängig von der verwendeten Substratkonzentration (0,5 - 10 mM Glycinslösungen) lag die beobachtete Wasseraufnahme im Mitteldarm mit 0,149 - 0,179 g Wasser/g Darmgewebe deutlich höher als im Rektum (0,047 - 0,063 g Wasser/ g Darmgewebe).

Auch in den eigenen Untersuchungen konnten deutliche Gewichtszunahmen der Darmsäckchen während der Inkubation festgestellt werden, die als Nettowasseraufnahme gewertet wurden. Da in dieser Hinsicht keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Konzentrationen beobachtet werden konnten, sind die Messergebnisse für beide Versuche (0,5 u. 1,0 mM) in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt. Die Sonderstellung der Ergebnisse bei einer Inkubationstemperatur von 5° C (signifikante Abnahme der Substratkonzentration) dürfte deshalb auf die gegenüber den beiden anderen Temperaturen stark erhöhte Wasseraufnahme zurückzuführen sein.

Tabelle 7: Wasseraufnahme in umgestülpte Darmsäckchen von Mitteldarm und Rektum junger Forellen (Inkubationsdauer: 120 min)

| Temperatur                                                                                      | n* | MITTELDARM                 | REKTUM                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----------------------------|----------------------------|
| g Wasseraufnahme/g Darmgewebe                                                                   |    |                            |                            |
| 5°C                                                                                             | 12 | 0,269 ± 0,071 <sup>a</sup> | 0,168 ± 0,047 <sup>b</sup> |
| 15°C                                                                                            | 15 | 0,054 ± 0,018 <sup>c</sup> | 0,038 ± 0,011 <sup>c</sup> |
| 25°C                                                                                            | 14 | 0,059 ± 0,012 <sup>c</sup> | 0,037 ± 0,015 <sup>c</sup> |
| * Tierzahl; Werte mit verschiedenen Buchstabenindices sind mit p< 0,05 voneinander verschieden. |    |                            |                            |

### 4.1.3 Lysin-Transport im Darm adulter Forellen (Versuch B)

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 72 adulten Regenbogenforellen mit einer durchschnittlichen Lebendmasse von  $432 \pm 41$  g durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den Tabellen 8 und 9 zusammengefaßt. Weitere Einzelheiten sind dem Anhang (Tab. A5-A8) zu entnehmen.

#### 4.1.3.1 Einfluß der Inkubationsdauer

Die im Hinblick auf den Einfluß der Inkubationsdauer bereits bei den Jungfischen getroffenen Feststellungen gelten in verstärktem Umfang auch für die Lysinaufnahme in umgestülpte Darmsäckchen adulter Regenbogenforellen. So konnte nach einer Inkubation von 60 min auch bei einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf  $25^{\circ}\text{C}$  kein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration über die Ausgangskonzentration (0,5 bzw. 1,0 mmol/l) hinaus festgestellt werden (Tab. 8).

**Tabelle 8: TRANSMURALER-LYSIN TRANSPORT IM DARMSÄCKCHEN ADULTER REGENBOGENFORELLEN**

| INKUBATION: 60 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol/l   |                 |                   |                 |
|----------------------------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| TEMPERATUR                                               | 5°C             | 15°C              | 25°C            |
| Tierzahl (n)                                             | 6               | 6                 | 6               |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)        | (mmol/l)          | (mmol/l)        |
| Mitteldarm                                               | $0,45 \pm 0,02$ | $0,47 \pm 0,01^*$ | $0,53 \pm 0,02$ |
| Rektum                                                   | $0,43 \pm 0,02$ | $0,45 \pm 0,03$   | $0,44 \pm 0,04$ |
| INKUBATION: 60 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol/l   |                 |                   |                 |
| Tierzahl (n)                                             | 6               | 6                 | 6               |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)        | (mmol/l)          | (mmol/l)        |
| Mitteldarm                                               | $0,90 \pm 0,02$ | $0,94 \pm 0,03$   | $1,07 \pm 0,09$ |
| Rektum                                                   | $0,86 \pm 0,03$ | $0,82 \pm 0,02$   | $0,95 \pm 0,02$ |
| * : signifikanter Anstieg der serösen Lysinkonzentration |                 |                   |                 |

Die bei 25°C beobachteten Konzentrationsgradienten (s/m) von 1,08 (0,5 mmol/l) bzw. 1,12 (1,0 mmol/l) müssen deshalb als zufallsbedingte Variationen, nicht aber als Hinweis auf einen aktiven Transport gegen ein Konzentrationsgefälle gewertet werden (Tab.: A5-A6). Nachfolgend werden deshalb nur die Ergebnisse, die bei einer verlängerten Inkubationszeit (120 min) festgestellt wurden, näher besprochen (Tab.: 9, A7-A8).

#### 4.1.3.2 Einfluß von Temperatur und Substratkonzentration

Auch nach einer zweistündigen Inkubation konnte ein signifikanter Anstieg der Lysinendkonzentration lediglich im Mitteldarm bei hoher Inkubationstemperatur (25°C) festgestellt werden (Tab.: 9). Die bei 15°C beobachteten Konzentrationsgradienten s/m von 1,04 (0,5 mmol/l) bzw. 1,03 (1,0 mmol/l) sind nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Die bei einer Inkubationstemperatur von 25°C im Mitteldarm beobachteten Gradienten (s/m) von 1,49 (0,5 mmol/l) bzw. 1,44 (1,0 mmol/l) waren mit einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Lysinendkonzentration auf 0,70 bzw. 1,33 mmol/l verbunden und belegen damit, daß L-Lysin auch im Mitteldarm adulter Forellen aktiv durch die Darmwand transportiert wird. Die korrespondierenden Daten für den serösen Transfer von Lysin wurden mit 4,56 (0,5 mM) bzw. 7,74  $\mu\text{mol/g DTG} \times 120 \text{ min}$  ermittelt.

Im serösen Medium umgestülpter Darmsäckchen des Rektums konnte unter den genannten Inkubationsbedingungen kein Konzentrationsanstieg über die Ausgangskonzentration hinaus beobachtet werden.

**Tabelle 9: TRANSMURALER LYSIN-TRANSPORT IM DARM ADULTER REGEN-BOGENFORELLEN**

| INKUBATION: 120 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol/l  |            |            |             |
|----------------------------------------------------------|------------|------------|-------------|
| TEMPERATUR<br>Tierzahl (n)                               | 5°C<br>6   | 15°C<br>6  | 25°C<br>6   |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)   | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,44 ±0,01 | 0,52 ±0,02 | 0,70 ±0,10* |
| Rektum                                                   | 0,40 ±0,01 | 0,45 ±0,01 | 0,48 ±0,04  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | ----       | 4,56 ±1,44  |
| Rektum                                                   | ----       | ----       | ----        |
| INKUBATION: 120 min - AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol/l  |            |            |             |
| Tierzahl (n)                                             | 6          | 6          | 6           |
| SERÖSE ENDKONZ.                                          | (mmol/l)   | (mmol/l)   | (mmol/l)    |
| Mitteldarm                                               | 0,91 ±0,03 | 1,01 ±0,01 | 1,33 ±0,20* |
| Rektum                                                   | 0,84 ±0,04 | 0,90 ±0,04 | 0,93 ±0,05  |
| SERÖSER TRANSFER                                         | μmol/g DTG | μmol/g DTG | μmol/g DTG  |
| Mitteldarm                                               | ----       | ----       | 7,74 ±4,45  |
| Rektum                                                   | ----       | ----       | ----        |
| * : signifikanter Anstieg der serösen Lysinkonzentration |            |            |             |

Ähnlich wie bei den Jungfischen (Versuch A) nimmt die Temperatur von 5°C eine Ausnahmestellung ein. Die starken Abnahmen der Lysinkonzentration im serösen Medium von Rektum und Mitteldarm (Tab. A7, A8) wurden ebenfalls im Zusammenhang mit extremen Gewichtszunahmen der inkubierten Darmsäckchen beobachtet. Allerdings waren diese als Wasseraufnahme zu interpretierenden Zunahmen weitaus stärkeren Schwankungen unterworfen als bei den Jungfischen. Die als Gewichtsänderungen der Säckchen gemessenen Nettowasserfluxe sind in Tabelle 10 als Gesamtmittelwerte der beiden Konzentrationsgruppen 0,5 und 1,0 mM zusammengefaßt.

**Tabelle 10:** Wasseraufnahme in umgestülpte Darmsäckchen von Mitteldarm und Rektum adulter Forellen (Inkubationsdauer: 120 min)

| Temperatur                                                                                         | n* | MITTELDARM                 | REKTUM                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----------------------------|----------------------------|
| g Wasseraufnahme/g Darmgewebe                                                                      |    |                            |                            |
| 5°C                                                                                                | 12 | 0,406 ± 0,156 <sup>a</sup> | 0,343 ± 0,147 <sup>a</sup> |
| 15°C                                                                                               | 12 | 0,105 ± 0,034 <sup>c</sup> | 0,089 ± 0,023 <sup>c</sup> |
| 25°C                                                                                               | 12 | 0,106 ± 0,042 <sup>c</sup> | 0,097 ± 0,028 <sup>c</sup> |
| * Tierzahl; Werte mit verschiedenen Buchstabenindices sind mit $p < 0,05$ voneinander verschieden. |    |                            |                            |

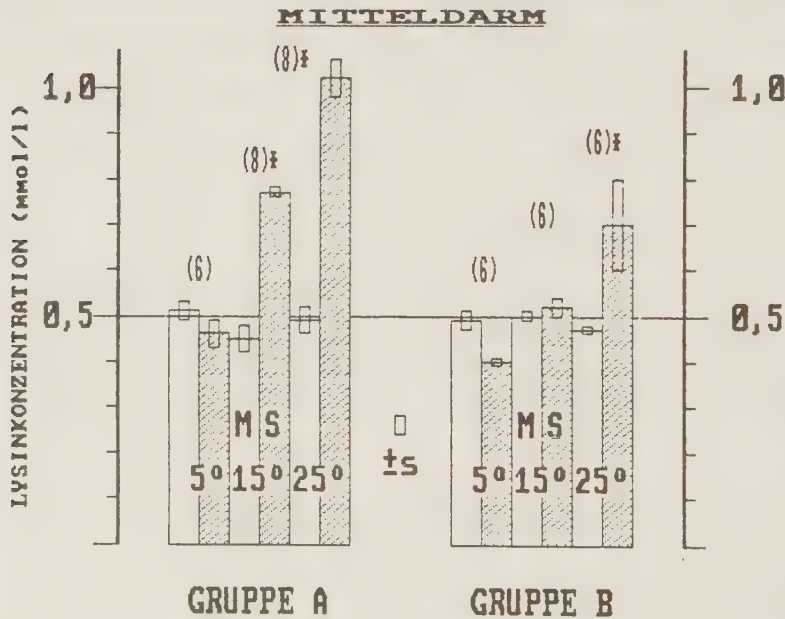
#### 4.1.4 Vergleich des transmuralen Lysin-Transportes bei Jungfischen und adulten Tieren

Die nach einer zweistündigen Inkubation im serösen und mucösen Medium umgestülpter Darmsäckchen von Jungfischen (Gruppe A) und adulten Forellen (Gruppe B) beobachteten Konzentrationsänderungen sind in den Abbildungen 1 (Mitteldarm) und 2 (Rektum) zusammenfassend dargestellt.

Im Gegensatz zu den bei Jungfischen (A) gemachten Beobachtungen konnte im Mitteldarm von adulten Tieren (B) lediglich bei einer Inkubationstemperatur von 25°C ein Nettolysintransport gegen ein Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden.

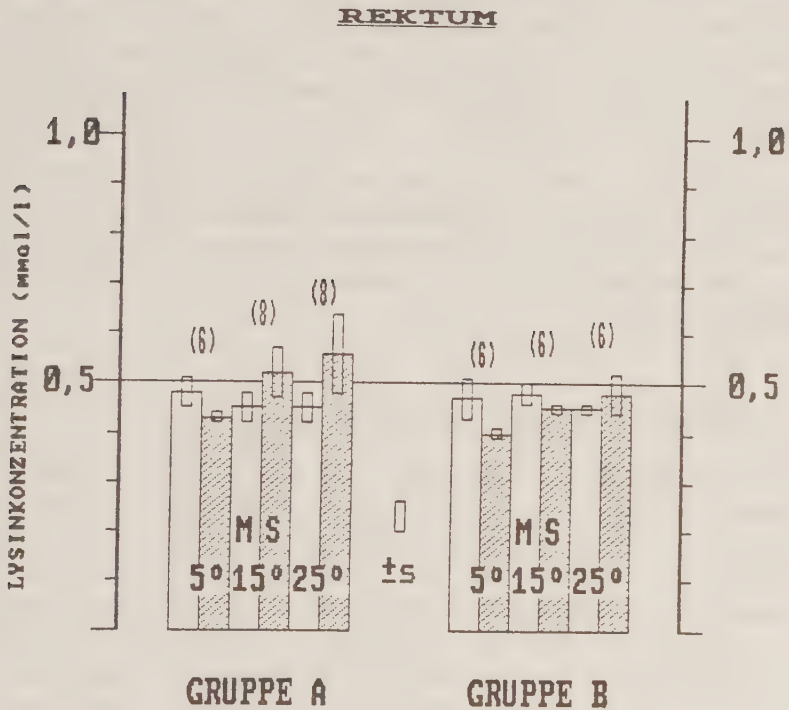
Der Transport von L-Lysin erfolgte dabei bei 25°C im Mitteldarm der Jungfische (Ausgangskonzentration: 0,5 mmol/l) gegen einen signifikant ( $p < 0,01$ ) höheren Konzentrationsgradienten (s/m: 2,08) als im gleichen Darmabschnitt der adulten Tiere (s/m: 1,49).

Die Unterschiede in der Endkonzentration des serösen Mediums spiegeln sich auch in den korrespondierenden Werten des serösen Transfers wider. Unter gleichen Inkubationsbedingungen (Temp.: 25°C; Ausgangskonzentration: 0,5 mmol/l; Abb.1) konnte im Mitteldarm der Jungfische ein Nettolysintransport (mucös-serös) beobachtet werden, der etwa 3mal so hoch (11,44  $\mu\text{mol/g DTG} \times 120 \text{ min}$ ) war wie im gleichen Darmabschnitt der adulten Forellen (4,56  $\mu\text{mol/g DTG} \times 120 \text{ min}$ ).



**Abb.: 1:** Änderung der Lysinkonzentration im serösen (S) und mucösen (M) Medium umgestülpter Mitteldarmsäckchen; Tierzahl in Klammern; \*: signifikanter Anstieg der serösen Endkonzentration nach 120 min

Im Rektum konnte dagegen weder bei juvenilen, noch bei adulten Forellen unter den genannten Bedingungen ein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration im serösen Medium beobachtet werden.



**Abb.: 2:** Änderung der Lysinkonzentration im serösen (S) und mucösen (M) Medium umgestülpter Darmsäckchen des Rektums nach 120 min; Tierzahl in Klammern.

## 4.2 Kinetik der intestinalen L-Lysinabsorption

Die Kinetik der Lysinaufnahme in die Mucosazellen verschiedener Darmabschnitte wurde an insgesamt 108 adulten Regenbogenforellen (mittlere Lebendmasse:  $435 \pm 98$  g) untersucht. Das von SCHARRER (1978) beschriebene einfache in-vitro Modell ermöglicht gegenüber dem "everted-gut-sac"-Modell die getrennte Untersuchung der intrazellulären Substrataufnahme durch die Bürstensaummembran (BSM) der Epithelzellen.

In vorhergehenden Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Lysinaufnahme bei allen 3 Temperaturen während der ersten 20 min linear ist. Die Konzentrationsabhängigkeit der Substrataufnahme wurde deshalb bei einer Inkubationsdauer von 15 min untersucht.

### 4.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Lysinaufnahme

Die Gesamtaufnahme von  $^3\text{H}$ -L-Lysin durch die BSM der Mucosazellen wurde im Konzentrationsbereich zwischen 0,05 und 2,0 mmol/l bei 5°, 15° und 25°C gemessen. Sowohl im Mitteldarm als auch im Rektum wurden jeweils 4 von proximal nach distal aufeinanderfolgende Segmente/Tier untersucht. Zwischen den Segmenten eines Darmabschnittes (Mitteldarm bzw. Rektum) konnten keine signifikanten Variationen der Aufnahmerate festgestellt werden. Der Mittelwert der jeweiligen 4 Segmente bildete deshalb die Basis bei der Berechnung der in Tabelle 11 angegebenen Gruppenmittelwerte. Die Abhängigkeit der Lysinaufnahme (Ordinate:  $\text{nmol}/\text{cm}^2 \times 15 \text{ min}$ ) von der Konzentration der Versuchslösung (Abszisse: mmol/l) ist in den Abbildungen 3, 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 11: Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembran der Mucosazellen in MITTELDARM (MD) und REKTUM (RE) (n = 108; Lebendmasse: 435 ± 98g;); die angegebenen Werte sind Mittelwerte von jeweils n = 6 Tieren/Konzentrations- und Temperaturstufe.

| [LYS]* | 5°C             | 15°C            | 25°C            |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|
| mmol/l | nmol/cm²x 15min | nmol/cm²x 15min | nmol/cm²x 15min |
| MD     | n.b.**          | 1,70 ± 0,31     | 3,29 ± 0,46     |
| 0,05   | ----            | n.s.**          | p < 0,05        |
| RE     | n.b.**          | 2,14 ± 0,37     | 4,79 ± 0,67     |
| MD     | 0,78 ± 0,09     | 3,84 ± 0,32     | 5,68 ± 0,82     |
| 0,10   | n.s.**          | p < 0,05        | p < 0,005       |
| RE     | 1,11 ± 0,10     | 5,06 ± 0,46     | 9,05 ± 1,38     |
| MD     | 1,81 ± 0,38     | 6,63 ± 0,81     | 9,73 ± 1,04     |
| 0,20   | n.s.**          | p < 0,05        | p < 0,01        |
| RE     | 2,13 ± 0,59     | 8,33 ± 0,52     | 14,14 ± 2,06    |
| MD     | n.b.**          | n.b.**          | 15,11 ± 2,60    |
| 0,30   | ----            | ----            | p < 0,05        |
| RE     | n.b.**          | n.b.**          | 19,63 ± 3,86    |
| MD     | n.b.**          | n.b.**          | 19,73 ± 3,14    |
| 0,40   | ----            | ----            | n.s.**          |
| RE     | n.b.**          | n.b.**          | 22,49 ± 2,96    |
| MD     | 4,53 ± 0,86     | 12,08 ± 2,92    | 21,28 ± 3,34    |
| 0,50   | n.s.**          | n.s.**          | n.s.**          |
| RE     | 4,97 ± 0,91     | 14,61 ± 2,03    | 25,78 ± 3,66    |
| MD     | 8,12 ± 1,37     | 22,04 ± 3,67    | 35,94 ± 6,72    |
| 1,00   | n.s.**          | n.s.**          | n.s.**          |
| RE     | 9,94 ± 3,70     | 24,79 ± 4,04    | 40,72 ± 5,57    |
| MD     | 17,50 ± 3,90    | 37,04 ± 4,93    | n.b.**          |
| 2,00   | n.s.**          | n.s.**          | ----            |
| RE     | 19,19 ± 2,34    | 39,73 ± 3,51    | n.b.**          |

\* : Lysinkonzentration der Versuchslösung

\*\* : n.b.: nicht bestimmt/ n.s.: nicht signifikant

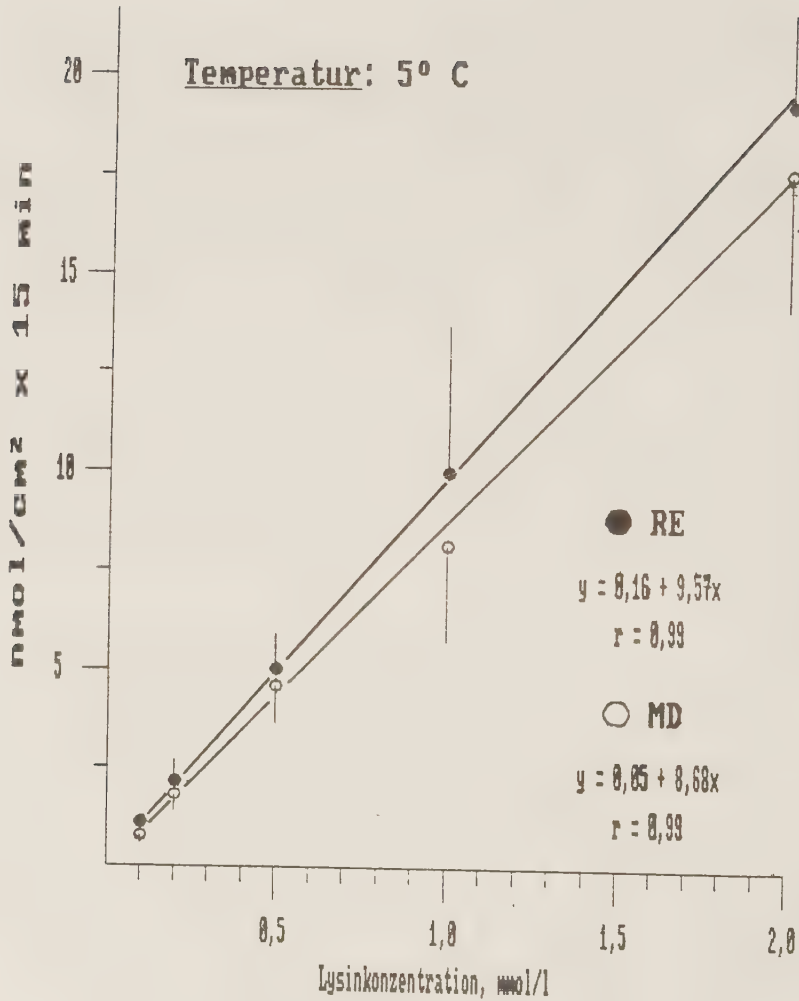
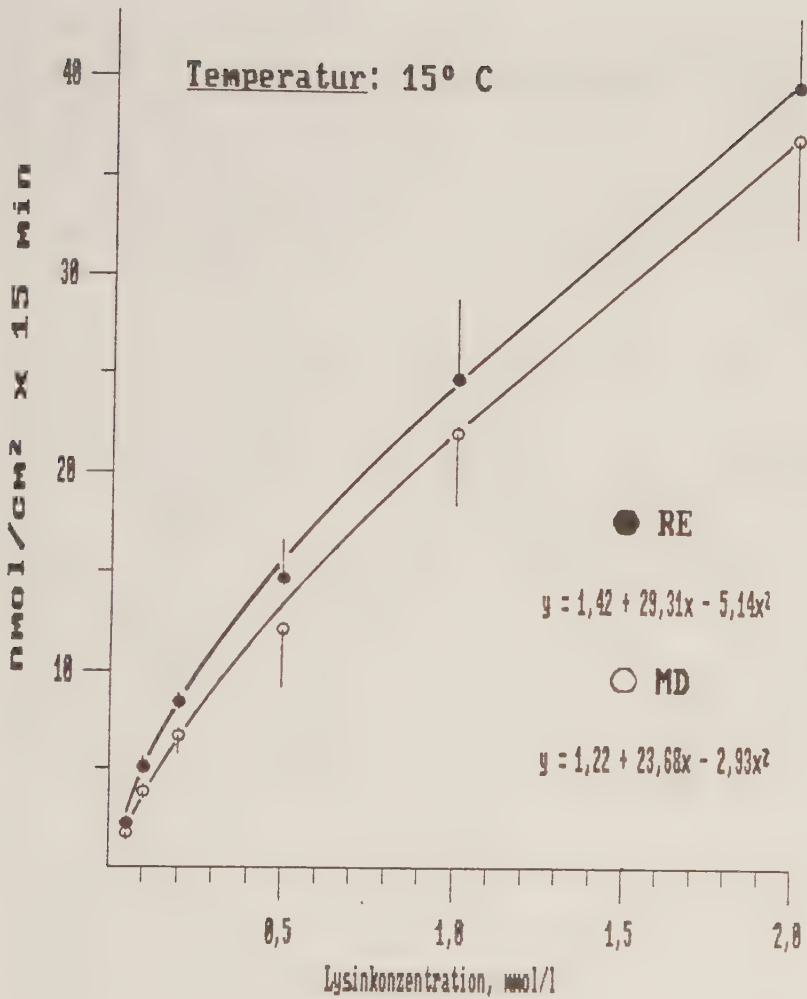


Abb. 3: Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembranen in Mitteldarm (MD) und Rektum (RE) adulter Regenbogenforellen bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 5° C; ; 6 Tiere / Konzentrationstufe; n = 30; Gewicht: 484 ± 102g.



**Abb. 4:** Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembranen in Mitteldarm (MD) und Rektum (RE) adulter Regenbogenforellen bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 15° C; ; 6 Tiere / Konzentrationstufe; n = 36; Gewicht: 489 ± 93g.

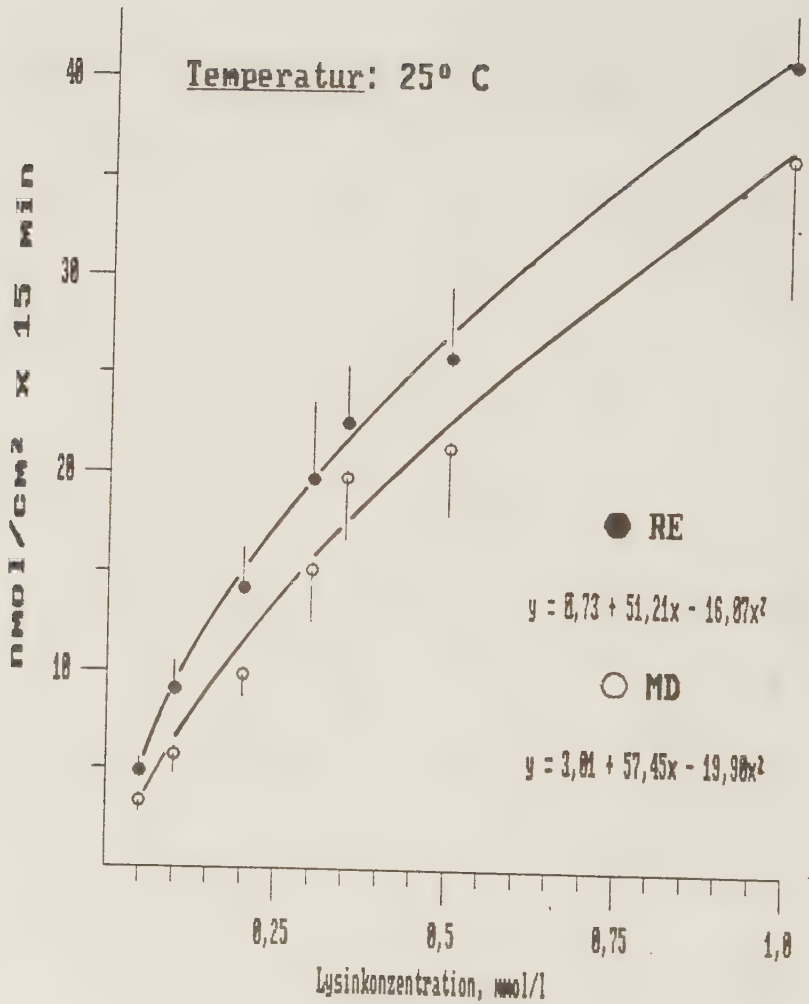


Abb. 5: Konzentrationsabhängigkeit der intrazellulären L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembranen in Mitteldarm (MD) und Rektum (RE) adulter Regenbogenforellen bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 25° C; ; 6 Tiere / Konzentrationstufe; n = 42; Gewicht: 462 ± 51g.

Aus Abbildung 3 geht hervor, daß bei einer Inkubationstemperatur von 5°C zwischen der Lysinkonzentration des Inkubationsmediums und der Substrataufnahme in die Mucosazellen eine lineare Abhängigkeit besteht. Eine Sättigung der Lysinaufnahme konnte innerhalb des geprüften Konzentrationsbereiches (0,1 bis 2,0 mmol/l) nicht festgestellt werden. Im Hinblick auf die Absorptionsrate konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Darmabschnitten Mitteldarm und Rektum festgestellt werden.

Die Abbildungen 5 (15°C) und 6 (25°C) belegen jedoch, daß die L-Lysinaufnahme sowohl im Mitteldarm, als auch im Rektum offensichtlich durch einen sättigbaren Prozeß erfolgt. Über den gesamten Konzentrationsbereich konnten bei beiden Temperaturen im Rektum höhere Absorptionsraten als im Mitteldarm gemessen werden (Tabelle 11). Die Unterschiede zwischen den beiden Darmabschnitten waren allerdings nur bei niedrigen Konzentrationen ( $< 1$  mmol/l) signifikant (Tab. 11).

Im Bereich höherer Lysinkonzentrationen konnte jedoch eine deutliche lineare Komponente festgestellt werden, die wahrscheinlich eine Substrataufnahme durch einfache Diffusion repräsentiert. Der Diffusionsanteil ( $y$ ) an der Gesamtaufnahme kann für alle Substratkonzentrationen  $x$  aus der Regressionsgleichung der "Diffusionsgeraden" mit der allgemeinen Formel  $y = a + bx$  berechnet werden (NEAME und RICHARDS, 1972). Für  $a = 0$  entspricht die Steigung ( $b$ ) dieser Geraden der Diffusionsgeschwindigkeit des Substrates, die aus dem linearen Bereich der Gesamtaufnahme bei höheren Lysinkonzentrationen (15°C: 1,0 - 2,0 mM; 25°C: 0,5 - 1,0 mmol/l) berechnet werden kann. Der Diffusionsanteil  $y$  (nmol/cm<sup>2</sup> x 15 min) wird bei 15°C durch Gleichungen  $y = 15,00x$  (Mitteldarm) bzw.  $y = 14,94x$  (Rektum), bei 25°C durch  $y = 29,32x$  (Mitteldarm) bzw.  $y = 29,88x$  (Rektum) beschrieben. Nach Korrektur der Werte aus Tabelle 11 (Gesamt-

aufnahme) durch einfache Subtraktion des Diffusionsanteils ( $y$ ), erhält man die saturable Komponente der Gesamtaufnahme (MATTHEWS et al., 1979), die dem Anteil des Carrier- vermittelten Lysintransportes entspricht (Abb. 6,7).

Die graphische Darstellung des sättigbaren Anteils der Lysinaufnahme in die Mucosazellen (Abb. 6,7) läßt deutlich erkennen, daß die maximale Transportrate für L-Lysin im Rektum sowohl bei 15°C (Abb. 6), als auch bei 25°C (Abb. 7) signifikant ( $p < 0,05$ ) höher ist als im Mitteldarm.

Die linearisierten Daten (LINEWEAVER und BURK, 1934) aus den Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß der Transport von L-Lysin durch die Bürstensaummembran der Mitteldarm- und Rektumepithelzellen einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Abb. 8 u. 9).

Aus den LINEWEAVER-BURK-DIAGRAMMEN die in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt sind, wurden die kinetischen Parameter  $V_{max}$  und  $K_m$  des Lysintransportes berechnet. Bei einer Inkubationstemperatur von 15°C (Abb. 8) wurde im Mitteldarm die maximale Transportrate  $V_{max}$  mit  $11,63 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$ , sowie  $K_m$  mit  $0,52 \text{ mmol/l}$  ermittelt. Bei einem nur numerisch ( $p > 0,05$ ) geringfügig abweichendem  $K_m$  von  $0,55 \text{ mmol/l}$ , konnte im Rektum eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Transportkapazität ( $V_{max} : 17,86 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$ ) festgestellt werden.

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 25°C (Abb. 9) hatte eine Steigerung der Substrataffinität des Carriers zur Folge, die sich in einer Erniedrigung der Michaelis-Menten-Konstanten auf  $K_m : 0,21 \text{ mmol/l}$  (Mitteldarm) bzw.  $K_m : 0,19 \text{ mmol/l}$  ausdrückt. Der Unterschied zwischen den beiden Darmabschnitten war allerdings nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Parallel zur gesteigerten Substrataffinität sank die maximale Transportkapazität ( $V_{max}$ ) im Mitteldarm auf  $9,17 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$ , im Rektum auf  $15,63 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$ . Auch bei der höheren Inkubationstemperatur von 25°C war der beobachtete Unterschied zwischen den maximalen Transportraten der beiden Darmabschnitte signifikant ( $p < 0,05$ ).

- 51 -  
Temperatur: 15° C

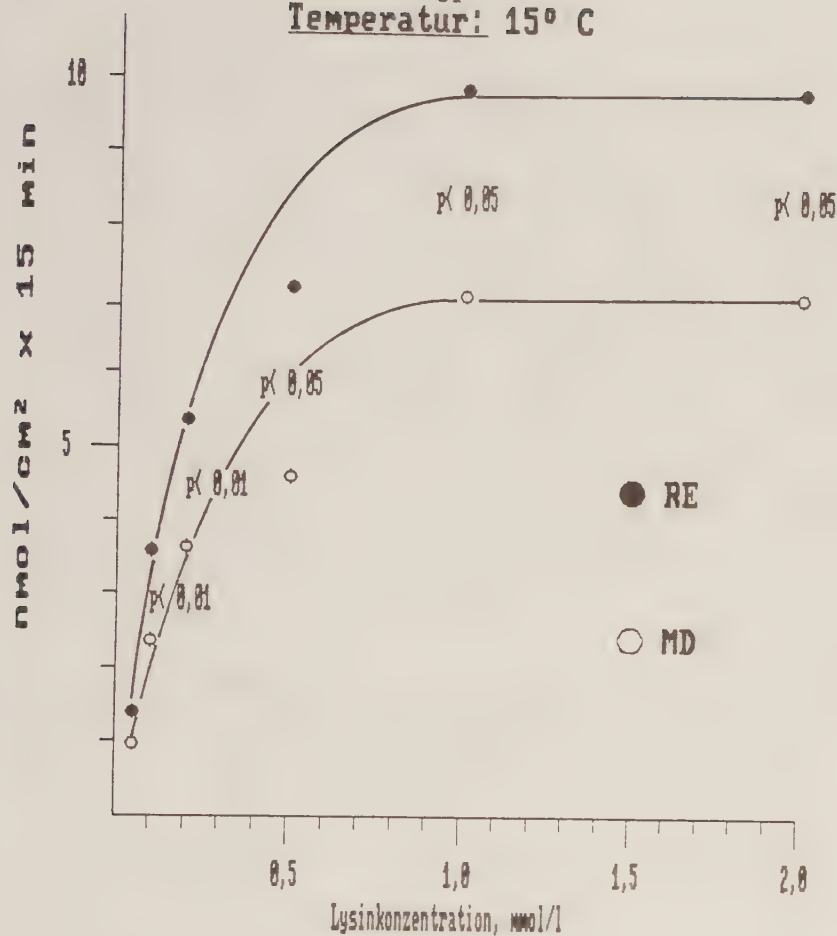


Abb. 6: Saturable Komponente der L-Lysinaufnahme in die Mucosazellen des Mitteldarms (MD) und Rektums (RE) adulter Regenbogenforellen bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von 15° C. Die Werte aus Abb. 4 (Gesamtaufnahme) wurden um den linearen Anteil korrigiert, der einer einfachen Diffusion entspricht.

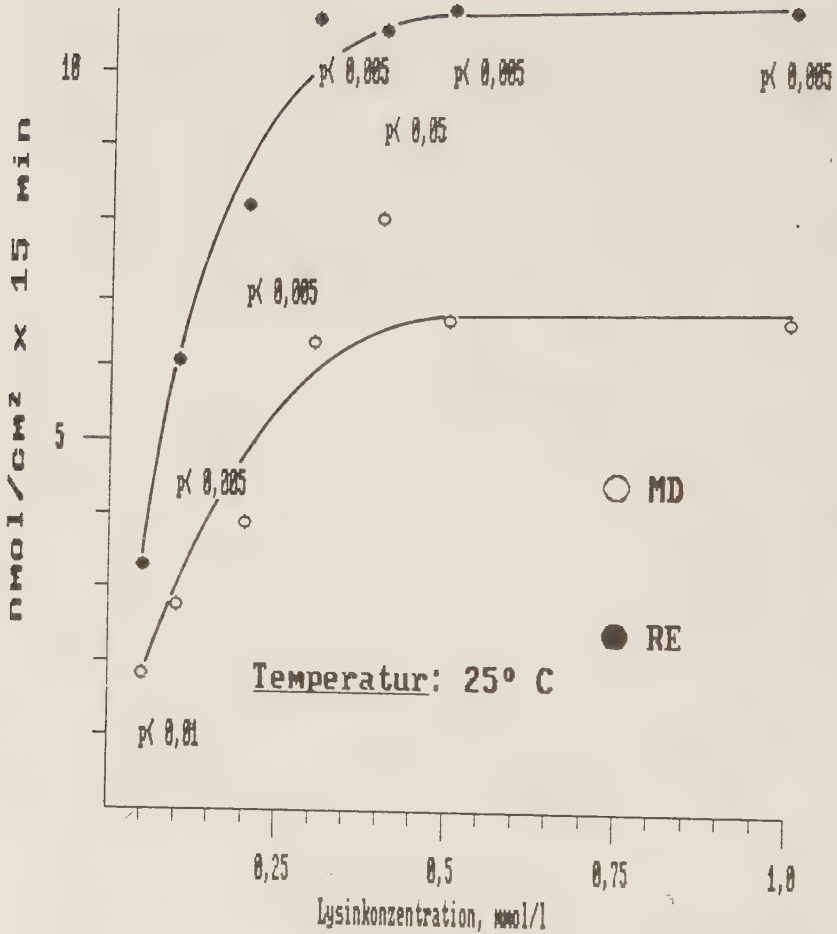


Abb. 7: Saturable Komponente der L-Lysinaufnahme in die Mucosazellen des Mitteldarms (MD) und Rektums (RE) adulter Regenbogenforellen bei einer Temperatur des Inkubationsmediums von  $25^\circ \text{C}$ . Die Werte aus Abb. 5 (Gesamtaufnahme) wurden durch Subtraktion des linearen Anteils korrigiert, der einer einfachen Diffusion entspricht.

#### 4.2.2 Effekt von 2,4 Dinitrophenol und Ouabain auf den intestinalen Lysin-Transport

Der Effekt der beiden Stoffwechsellinhibitoren 2,4 Dinitrophenol (2,4 DNP) und Ouabain auf die intrazelluläre L-Lysinaufnahme wurde bei einer Inkubationstemperatur von 25°C gegenüber einer Kontrollgruppe (0,1 mM Lysinlösung) untersucht. Beide Substanzen wurden der Versuchslösung (0,1 mmol Lysin/l KHB) in einer Konzentration von 1 mmol/l zugesetzt. Aus Untersuchungen an Säugern (LUSIER und ROBINSON, 1973) und Fischen (CARTIER et al, 1979, BOGÈ et al., 1979b) ist bekannt, daß die intrazelluläre Akkumulation von Aminosäuren und Monosacchariden erst gehemmt wird, wenn die intrazelluläre Na<sup>+</sup>-Konzentration entscheidend verändert wurde. Um diese "lag-Phase" (LUSIER und ROBINSON, 1973) zu kompensieren, wurde OUABAIN bereits während der Vorinkubation (15 min in KHB) zugesetzt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 12 zusammengefaßt.

**Tabelle 12:** Effekt von OUABAIN und 2,4 DNP auf die intrazelluläre <sup>3</sup>H-L-Lysinaufnahme in Mitteldarm (MD) und Rektum (RE) adulter Regenbogenforellen; Inkubationstemperatur: 25°C; n = 6 Tiere / Gruppe; Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Präparate an.

| VERSUCHSLÖSUNG     |    | LYSINABSORPTION<br>(nmol/cm <sup>2</sup> x 15 min) | INHIBITOREFFEKT<br>(% d. Kontrolle) |
|--------------------|----|----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| KONTROLLE*         | MD | 5,68 ± 0,82 (24)                                   | ----                                |
|                    | RE | 9,05 ± 1,38 (24)                                   | ----                                |
| + 1 mmol OUABAIN/l | MD | 2,35 ± 0,91 (23)                                   | 59 %(p<0,005)**                     |
|                    | RE | 3,83 ± 1,74 (24)                                   | 58 %(p<0,005)**                     |
| + 1 mmol 2,4 DNP/l | MD | 5,53 ± 0,71 (21)                                   | 3 % n.s.                            |
|                    | RE | 4,57 ± 1,62 (23)                                   | 50 %(p<0,005)**                     |

\* : 0,1 mM L-Lysinlösung in KHB

\*\* : signifikanter Unterschied zur Kontrolle

Die intrazelluläre Aufnahme von L-Lysin wurde durch den Zusatz von OUABAIN (1 mmol/l) sowohl im Mitteldarm, als auch im Rektum signifikant ( $p < 0,005$ ) gehemmt. Dabei wurde mit 59% (Mitteldarm) bzw. 58% (Rektum) in beiden untersuchten Darmabschnitten der gleiche inhibitorische Effekt erzielt. Die verbliebene "Restaufnahme" von L-Lysin entspricht mit  $2,35 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$  im Mitteldarm bzw.  $3,83 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$  im Rektum praktisch dem "Diffusionsanteil" an der Gesamtaufnahme, der für eine Lysin-konzentration von 0,1 mmol/l mit 2,93 (Mitteldarm) bzw. 2,99  $\text{nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$  (Rektum) berechnet werden kann (vgl. 4.2.1.).

Der Zusatz von 2,4 DNP (1 mmol/l) zum Inkubationsmedium führte lediglich im Rektum zu einer signifikanten ( $p < 0,005$ ) Reduzierung der L-Lysinaufnahme um 50 % von 9,05 (Kontrolle) auf  $5,67 \text{ nmol/cm}^2 \times 15 \text{ min}$ . Im Mitteldarm dagegen konnte nach einer Inkubationsdauer von 15 min lediglich eine nicht signifikante Verringerung der Absorptionsrate um 3% von 5,68 (Kontrolle) auf  $5,53 \text{ nmol/cm}^2$  festgestellt werden.

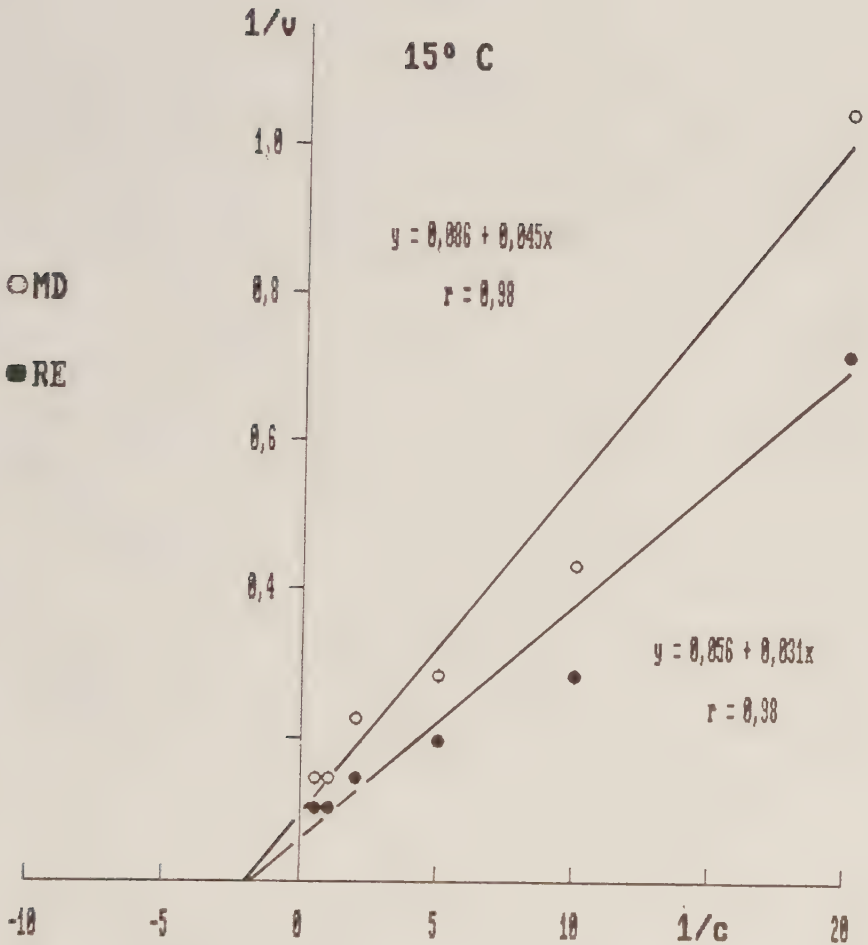


Abb. 8: LINEWEAVER-BURK-DIAGRAM der Daten aus Abb. 6; die Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden aus den angegebenen Regressionsgleichungen berechnet. Mitteldarm (MD):  $K_m$ : 0,52 mmol/l;  $V_{max}$ : 11,63 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min; Rektum (RE):  $K_m$ : 0,55 mmol/l;  $V_{max}$ : 17,86 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min.

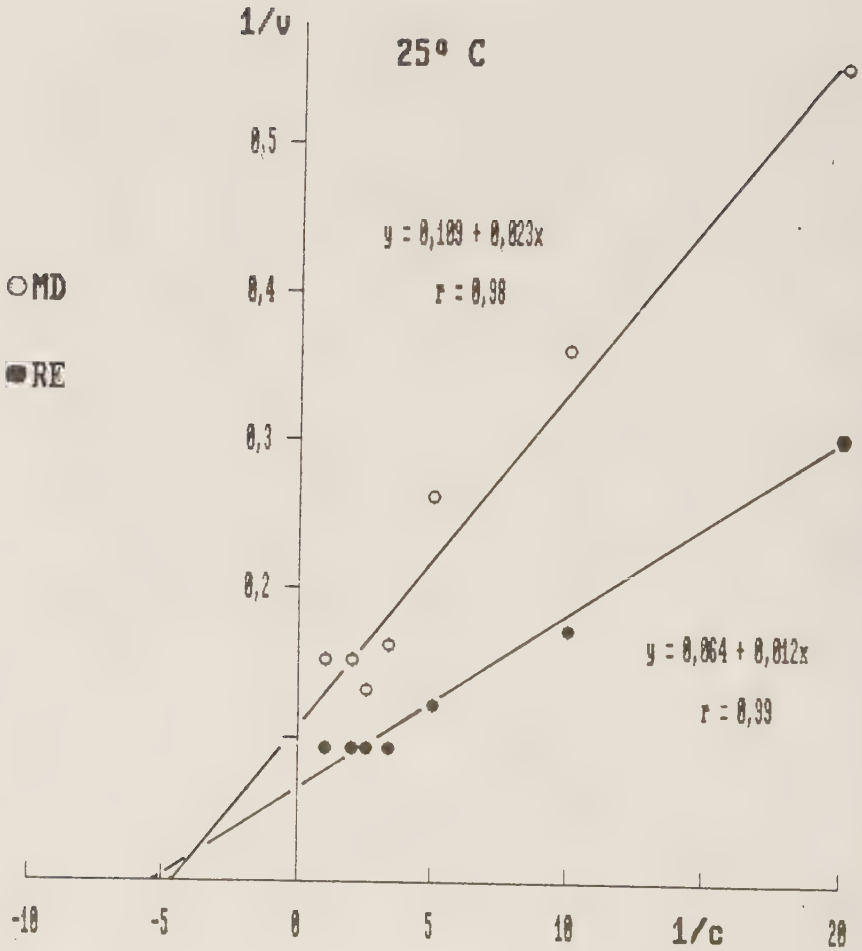


Abb. 9: LINEWEAVER-BURK-DIAGRAM der Daten aus Abb. 7; die Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden aus den angegebenen Regressionsgleichungen berechnet. Mitteldarm (MD):  $K_m$  : 0,21 mmol/l;  $V_{max}$  : 9,17 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min; Rektum (RE):  $K_m$ : 0,19 mmol/l;  $V_{max}$ : 15,63 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min.

## 5. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden in-vitro Untersuchungen war es, die Absorption basischer Aminosäuren im Darm von Regenbogenforellen am Beispiel der intestinalen L-Lysinaufnahme näher zu charakterisieren. Dabei wurde sowohl der transmurale Lysin-Transport als auch die L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembran der Mucosazellen untersucht.

### 5.1 Transmuraler Lysin-Transport

Der transmurale Lysin-Transport wurde mit der "everted-gut-sac"-Methode im Mitteldarm und Rektum von Jungfischen und adulten Regenbogenforellen untersucht.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eindeutig, daß L-Lysin im Mitteldarmabschnitt von Regenbogenforellen durch aktiven Transport gegen ein Konzentrationsgefälle absorbiert wird. Im Gegensatz dazu konnte im Rektum der untersuchten Regenbogenforellen kein transmuraler Nettotransport von Lysin festgestellt werden. Allerdings wies die Endkonzentration von Lysin im serösen Medium umgestülpter Darmsäckchen des Rektums eine gewisse Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur auf. So konnte bei Jungfischen mit einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 25°C ein Anstieg der Aminosäurenkonzentration auch im serösen Medium umgestülpter Darmsäckchen des Rektums gemessen werden. Der beobachtete Anstieg über die Ausgangskonzentration (0,5 mmol/l) hinaus war jedoch nicht signifikant. Ein Konzentrationsgradient  $>1$  konnte deshalb nicht als Beweis eines aktiven Lysintransportes im Rektum gewertet werden.

Im Mitteldarm adulter Regenbogenforellen konnte bei gleicher Ausgangskonzentration im serösen und mucösen Medium ein signifikanter Anstieg der Lysinkonzentration auf der serösen Seite erst nach einer Verlängerung der Inkubationszeit von 60 auf 120 min bzw. nach einer Erhöhung der Inkubationstemperatur von 15° auf 25°C nachgewiesen werden. Der verzögerte Anstieg der Amino-

säurenkonzentration im serösen Medium kann dabei auf einen prinzipiellen Nachteil des verwendeten Transportmodells zurückgeführt werden. Nur der erste Transportschritt, die Aufnahme des Substrates durch die Bürstensaummembran (BSM) erfolgt mit relativ hoher Geschwindigkeit durch aktiven Transport. Die anschließende Füllung der subepithelialen Gewebe erfolgt dagegen wesentlich langsamer durch einfache Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. In Abhängigkeit von der Transportrate durch die BSM, sowie der Schichtdicke und Durchlässigkeit der darunterliegenden Darmwandschichten sind Änderungen der Substratkonzentration im serösen Medium insbesondere bei niedrigen Temperaturen immer erst mit einer mehr oder weniger großen Zeitverzögerung feststellbar (KITCHIN und MORRIS, 1971; STOKES und FROMM, 1964).

In Hinblick auf die lange Inkubationsdauer stellt sich die Frage nach der "Überlebensfähigkeit" des isolierten Darmgewebes unter in-vitro Bedingungen. INGHAM und ARME (1977) konnten durch Messungen der Sauerstoffaufnahme zeigen, daß in-vitro Präparate des Forellendarmes bei einer Inkubationstemperatur von 10°C ihre physiologischen Stoffwechselfunktionen über mehr als 2 Stunden aufrechterhalten. Andere Autoren berichten über die Verwendbarkeit von Darmpräparaten der Regenbogenforelle von mehr als 2 h bei Temperaturen von 14° und 21°C (STOKES und FROMM, 1964), 19°C (WARD, 1968), sowie bei 37°C (HOKAZONO et al., 1979). Wertet man den aktiven Transport einer Aminosäure als Zeichen eines intakten Zellstoffwechsels, kann deshalb auch in der vorliegenden Untersuchung davon ausgegangen werden, daß die Funktionen des Darmgewebes durch die relativ lange Inkubationsdauer nicht negativ beeinflusst wurden.

Ein weiteres Problem, das sich aus der langen Inkubation ergibt, besteht in der möglichen Metabolisierung der Aminosäure während des Transportes durch alle Schichten der Darmwand. Die Ergebnisse der papierchromatographischen Untersuchung des serösen Mediums nach der Inkubation zeigen jedoch eindeutig, daß L-Lysin beim transmuralen Transport nur in sehr geringem Umfang

verstoffwechselt wird. Die Wiederfindungsrate für Lysin lag dabei unabhängig vom Alter der untersuchten Tiere sowohl im Mitteldarm als auch im Rektum zwischen 92 und 98 %. Die beobachteten Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Wiederfindungsrate, die FINCH und HIRD (1960) für den in-vitro Transport von L-Lysin im Darm von Ratten angeben. Die Autoren fanden nach einer Inkubation von 50 min (37°C) 95% des Lysins im serösen Medium in unveränderter Form wieder. INGHAM und ARME (1977) geben für den intestinalen Transport von L-Leucin bei Regenbogenforellen nach einer einstündigen Inkubation bei 10° C ebenfalls Wiederfindungsraten von mehr als 90 % an.

Die Versuchsergebnisse zeigen weiterhin, daß der aktive Transport von Lysin durch einen temperatursensitiven, konzentrationsabhängigen Prozeß erfolgt. Eine Temperaturerhöhung um 10°C, von 15° auf 25°C hatte eine Steigerung des serösen Lysintransfers um das 1,8 bis 2,0fache zur Folge. Bei einer Inkubationstemperatur von 5° C konnte kein Transport von Lysin durch die Darmwand nachgewiesen werden. Allerdings wurde bei dieser Temperatur eine signifikant erhöhte Wasseraufnahme in die Darmsäckchen festgestellt, die eine signifikante Abnahme der Substratkonzentration im serösen Medium unter die Ausgangskonzentration zur Folge hatte. Obwohl dadurch keine Konzentrationsgradienten  $s/m > 1$  beobachtet werden konnten, kann ein Lysintransfer zur Serosaseite nicht völlig ausgeschlossen werden.

Die Verdopplung der Lysinkonzentration im Inkubationsmedium von 0,5 auf 1,0 mmol/l führte dagegen nicht zu einer Verdopplung der Transportrate. So wurde der seröse Transfer lediglich um das 1,4fache gesteigert, was als Hinweis auf eine mögliche Sättigung des Transportsystems im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 1,0 mmol/l bewertet werden kann.

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, daß im Mitteldarm von Jungfischen (mittlere Lebendmasse: 71 g) L-Lysin gegen einen signifikant höheren Konzentrations-

gradienten transportiert wird als im gleichen Darmabschnitt adulter Forellen (Gewicht: 432 g). Unter gleichen Inkubationsbedingungen (25°C; 0,5 mM L-Lysinlösung) wurde von den Jungfischen, bezogen auf gleiches Darmtrockengewicht, die 3fache Menge der Aminosäure gegen ein Konzentrationsgefälle transportiert wie im Darm der adulten Tiere.

Die erhöhte Transportkapazität im Darm junger Fische kann im Sinne einer Anpassung an den höheren Aminosäurenbedarf während der Phase intensiven Wachstums interpretiert werden.

## 5.2 Kinetik der L-Lysinabsorption

Die Kinetik der L-Lysinaufnahme durch die Bürstensaummembran der Mucosazellen des Darmes wurde mit der von SCHARRER (1978) beschriebenen in-vitro Methode an adulten Regenbogenforellen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen belegen, daß die intrazelluläre Aufnahme von L-Lysin in Mitteldarm und Rektum adulter Regenbogenforellen durch einen saturablen, temperaturabhängigen Transportprozeß erfolgt, der einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

Bei einer Inkubationstemperatur von 15° C, die der mittleren Vorzugstemperatur der kaltwasseradaptierten Regenbogenforellen entspricht, konnte ein  $K_m$  von 0,52 mmol/l im Mitteldarm und von 0,55 mmol/l im Rektum ermittelt werden. Der geringfügige Unterschied in der Substrataffinität des Carriers in den beiden Darmabschnitten ist nicht signifikant. Allerdings wurde im Rektum eine signifikant höhere maximale Transportkapazität ( $V_{max}$ : 17,86 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min) als im Mitteldarm ( $V_{max}$ : 11,62 nmol/cm<sup>2</sup> x 15min) festgestellt.

Eine Temperaturerhöhung um 10°C auf 25°C hatte eine Verdopplung der Substrataffinität des Transportsystems in beiden Darmabschnitten zur Folge. Auch bei dieser Inkubationstemperatur konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden er-

rechneten  $K_m$ -Werten (Mitteldarm: 0,21 mmol/l; Rektum: 0,19 mmol/l) festgestellt werden. Entsprechend der höheren Affinität und der damit verbundenen größeren Stabilität des Substrat-Carrier-Komplexes konnte eine Abnahme der Maximalgeschwindigkeit auf 9,17 (Mitteldarm) bzw. 15,63 nmol/cm<sup>2</sup> x 15 min (Rektum) beobachtet werden. Auch bei dieser Temperatur war der Unterschied zwischen den beiden Darmabschnitten signifikant.

Die höhere maximale Transportkapazität im Rektum kann bei gleicher Substrataffinität des Transportsystems in Mitteldarm und Rektum, nur mit einer höheren Anzahl der Carriersysteme für Lysin im Rektum erklärt werden.

Die Untersuchungsergebnisse stehen damit im Einklang mit den Befunden von INGHAM und ARME (1977), BOGŽ et al. (1977, 1979a,b), sowie von MARCOTTE und DE LA NOUVE (1984), die ebenfalls die Bedeutung des distalen Darmabschnittes für die Aminosäurenabsorption bei Regenbogenforellen belegen.

Ein Vergleich der kinetischen Daten mit anderen bisher an Forellen durchgeführten Untersuchungen muß auf die Betrachtung der  $K_m$ -Werte beschränkt bleiben, da die maximalen Transportraten auf Grund der unterschiedlichen Bezugsgrößen (Darmtrockengewicht, Darmnaßgewicht) nur sehr bedingt vergleichbar sind. Im Vergleich zu den  $K_m$ -Werten für den Transport neutraler Aminosäuren ist die in der eigenen Untersuchung beobachtete Substrataffinität des Lysincarriers sehr hoch ( $K_m$  : 0,52 bzw. 0,55 mmol/l bei 15°C). INGHAM und ARME (1977) geben für den L-Leucintransport im Mitteldarm von Forellen bei 10°C ein  $K_m$  von 2,73 mmol/l an. Für den Glycintransport (20°C) im Mitteldarm ermittelten BOGŽ et al. (1979b) ein  $K_m$  von 52,46, im Rektum ein  $K_m$  von 10,75 mmol/l. Vergleichswerte für den Transport basischer Aminosäuren konnten lediglich für den Lysintransport im Darm von Ratten gefunden werden. SCHARRER et al. (1981) notierten dabei einen  $K_m$ -Wert von 0,89 mmol/l für

den Lysintransport im Dünndarm von Ratten, an die eine Diät mit erhöhtem Proteingehalt verfüttert worden war, sowie von 0,26 mmol/l bei Ratten die eine Ration mit hohem Kohlehydratanteil erhalten hatten.

Durch den Zusatz von Ouabain, einem spezifischen Hemmstoff der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , die für die Aufrechterhaltung eines ins Zellinnere gerichteten  $\text{Na}^+$ -Gradienten verantwortlich ist, konnte die Lysinaufnahme in beiden Darmabschnitten um mehr als 50 % reduziert werden. Der beobachtete Effekt spricht dafür, daß der Transport basischer Aminosäuren, ebenso wie die aktive Absorption neutraler Aminosäuren im Darm von Regenbogenforellen (INGHAM und ARME, 1977; BOGÈ et al. 1979b) durch einen transmembranalen  $\text{Na}^+$ -Gradienten energetisiert wird.

Der Zusatz von 2,4 Dinitrophenol, das die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien hemmt, zeigte einen unterschiedlichen Effekt in Mitteldarm und Rektum. Während die Lysinaufnahme im Rektum durch 2,4 DNP erwartungsgemäß um 50 % reduziert wurde, blieb die Substanz unter den gleichen Bedingungen im Mitteldarm wirkungslos. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für den intestinalen Transport von Glycin bei Regenbogenforellen gemacht werden (BOGÈ et al., 1979b). In der genannten Untersuchung konnte eine deutliche Wirkung von 2,4 DNP auf den Glycintransport erst nach längerer Einwirkung (60 min) beobachtet werden. Die eigenen Ergebnisse unterstützen dabei die Meinung von BOGÈ et al. (1979b), nach der die für den aktiven Transport benötigte Energie im Darm von Forellen auch durch anaerobe Glycolyse bereitgestellt werden kann. DE LA NOÛE (1970) konnte einen aktiven Transport von Aminosäuren im Rattendarm auch unter anaeroben Bedingungen nachweisen. Allerdings war die anaerobe Glycolyse in diesen Experimenten an die Anwesenheit exogen zugeführter Glucose im Inkubationsmedium gebunden.

Im Darm von Regenbogenforellen kann die für den aktiven Substrattransport notwendige Energie in Form von ATP auch auf anaerobem Weg gewonnen werden. BOG~~x~~ et al. (1979b) schließen aus früheren Versuchen (BOG~~x~~, 1972), daß die Forelle nicht auf exogene Glucose angewiesen ist, sondern möglicherweise Glycogen entsprechend verwertet.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die intestinale Absorption von L-Lysin wurde in vitro an Regenbogenforellen (*Salmo gairdnerii* R.) untersucht.

Mit der "everted-gut-sac"-Methode konnte ein aktiver transmuraler Transport von radioaktiv markiertem L-Lysin gegen einen Konzentrationsgradienten im Mitteldarm von juvenilen und adulten Forellen nachgewiesen werden. Die Transportrate wurde sowohl durch die Lysinkonzentration als auch durch die Temperatur des Inkubationsmediums beeinflusst. Bezogen auf gleiches Darmtrockengewicht war die gegen ein Konzentrationsgefälle transportierte Lysinmenge im Darm von juvenilen Regenbogenforellen 3mal höher als im Darm der adulten Tiere.

Kinetik und Topographie des L-Lysintransportes durch die Bürstensaummembran (BSM) der Mucosazellen wurden mit dem von SCHARRER (1978) beschriebenen in-vitro Transportmodell an adulten Regenbogenforellen untersucht. Die intrazelluläre L-Lysinaufnahme erfolgt durch einen saturablen, temperatursensitiven Transportprozeß. Bei einer Inkubationstemperatur von 15°C, die der mittleren Vorzugstemperatur der Regenbogenforelle entspricht, konnte ebenso wie bei einer Temperatur von 25°C im Rektum eine signifikant höhere maximale Transportrate ( $V_{max}$ ) als im Mitteldarm festgestellt werden. Die Substrataffinität des Carriersystems ( $K_m$ ) war dagegen in beiden untersuchten Darmabschnitten gleich.

Die Hemmbarkeit der Lysinaufnahme durch Ouabain spricht dafür, daß der L-Lysintransport durch die BSM ebenso wie bei Säugern durch einen transmembranalen  $Na^+$ -Gradienten energetisiert wird. Die fehlende Wirkung von 2,4 DNP auf den Lysintransport im Mitteldarm zeigt, daß im Gegensatz zu Säugern bei Forellen die für den aktiven intestinalen Transport benötigte Energie zum Teil aus dem anaeroben Abbau endogener Energiequellen bereitgestellt werden kann.

IN-VITRO STUDIES ON INTESTINAL TRANSPORT OF LYSINE IN RAINBOW TROUT (*SALMO GAIIRDNERII* R.)

The intestinal absorption of l-lysine in rainbow trout was examined in vitro.

Using the everted-gut-sac technique an active transmural transport of radioactive labelled l-lysine against a concentration gradient was demonstrated in the midgut of juvenile and adult rainbow trout. The rate of amino acid transport was influenced by lysine concentration and by temperature of the incubation medium. Related to the same dry weight of intestine the amount of lysine transported against a concentration gradient in juvenile rainbow trout intestine was three times of that transported in adult fish.

Kinetic and topographic aspects of l-lysine transport through the brush border membranes of the mucosal cells were examined in adult rainbow trout by using the in-vitro transport model described by SCHARRER (1978). Intracellular uptake of l-lysine occurred by a saturable transport process which was sensitive for temperature. When incubation temperature was 15 and 25° C, respectively, the rectum shows a significantly higher  $V_{max}$  than the midgut, whereas  $K_m$  was the same in both intestinal segments.

Inhibition of lysine uptake by ouabain suggests that l-lysine uptake through the brush border is energized by a transmembranal  $Na^{+}$  gradient as in mammals. Inhibition by 2,4 DNP occurred only in the rectum but not in the midgut. This observation indicates that in rainbow trout in opposition to the known properties of mammals the energy supply needed for intestinal transport could be achieved in part by anaerobic glycolysis of endogenous energy sources.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

ADIBI, S.A. und D.W. MERCER (1973):

Protein digestion in human intestine as reflects  
luminal, mucosal and plasma amino acid concentrations  
after meals.

J. clin. Invest. 52, 1594

ADIBI, S.A. und Y.S. KIM (1981):

Peptide absorption and hydrolysis. In: Physiology in  
gastrointestinal tracts, Vol. 2 (L.R. JOHNSON ed.) Raven  
Press, New York, 1073 - 1095

AGAR, W.T., F.J. HIRD und G.S. SIDHU (1954):

The uptake of amino acids by the intestine.

Biochim. biophys. Acta 14, 80 - 84

ALBUS, H. und J.S. SIEGENBEEK VAN HEUKELOM (1976):

The electrophysiological characteristics of glucose  
absorption of the goldfish intestine as compared to  
mammalian intestines.

Comp. Biochem. Physiol. 54A, 113 - 119

ALBUS, H., R. BAKKER und J.S. SIEGENBEEK VAN HEUKELOM (1983a):

Circuit analysis of membrane potentials changes due to  
electrogenic sodium dependent sugar transport in  
goldfish intestinal epithelium

Pflügers Arch. 398 (1), 1 - 9

ALBUS, H., F. LIPPENS und J.S. SIEGENBEEK VAN HEUKELOM (1983b):

Sodium-dependent sugar and amino acid transport in  
isolated goldfish intestinal epithelium: evidence  
against direct interactions at the carrier level.

Pflügers Arch. 398 (1), 10 - 17

ALVARADO, F. und J. MONREAL (1967):

Na<sup>+</sup>-dependent active transport of phenylglycosides in  
the chicken small intestine: a general model. Amino acid  
transport

Comp. Biochem. Physiol. 20, 471 - 488

ANDERSON, J.W. (1964):

The use of antiferritin serum in the transport of antibodies

J. cell. Biol. 23, A 4

ASH, R. (1979):

The hydrolysis of dipeptides by mucosa from different regions of the alimentary tract of the brown trout (*Salmo trutta*)

Proc. Nutr. Soc. 38, A 16

ASH, R. (1980):

Hydrolytic capacity of the trout (*Salmo gairdneri*) intestinal mucosa with respect to three specific dipeptides

Comp. Biochem. Physiol. 65B, 173 - 176

BERTELOOT, A. (1984):

Characteristics of glutamic acid transport by rabbit intestinal brush border membrane vesicles. Effects of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>-gradients

Biochim. biophys. Acta 775, 129 - 140

BOGÉ, G. (1972):

Recherches sur la nature et les caractéristiques de l'absorption in vitro du glyco-colle et du sodium par l'intestin de la Truite Arc en Ciel (*Salmo gairdnerii*)

Thèse Doctorat de Spécialité, Lyon

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1977):

Résultats obtenus chez la truite arc-en-ciel concernant l'absorption du glyco-colle par l'intestin postérieur: rôle du sodium dans les différences observées

Anns. Biol. anim. Biochem. Biophys. 17, 637 - 643

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1978):

Recherches concernant l'absorption intestinale du glycocholate chez la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri* R.). Mise en évidence in vitro et in vivo de ses caractéristiques et de l'influence de quelques facteurs du milieu.

Thèse Doctorat des Sciences, Lyon

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1979a):

A study of intestinal absorption in vivo and in vitro of different concentrations of glycine by the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson)

Comp. Biochem. Physiol. 62A (4), 831 - 836

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1979b):

A study of energized transport mechanisms of glycine absorption by the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson).

Comp. Biochem. Physiol. 64A, 537 - 541

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1981):

Rates of in vivo intestinal absorption of glycine and glycyl-glycine by rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)

Comp. Biochem. Physiol. 69A, 455 - 459

BOGÉ, G., A. RIGAL und G. PÉREZ (1982):

The use of intestinal brush border membrane vesicles for comparative studies of glucose and 2-amino isobutyric acid transport by four species of marine teleosts.

Comp. Biochem. Physiol. 72A (1), 85 - 89

BRAMBELL, F.W.R. (1958):

The passive immunity of the young mammal.

Biol. Rev. 33, 488 - 531

BUCLON, M. (1974):

Bioelectric potentials and the transfer of amino acids across the digestive epithelium of the tench (*Tinca tinca* L.).

J. Physiol. (Paris) 68, 157 - 180

**BULLOCK, W.L. (1963):**

Intestinal histology of some salmonid fishes with particular reference to the histopathology of acanthocephalan infections.

J. Morphol. 112, 23 - 24

**CARLISKY M.J. und K.C. HUANG (1962):**

Glucose transport by the intestinal mucosa of the dogfish.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109, 405 -408

**CARTIER, M., M. BUCLON und J.W.L. ROBINSON (1979):**

Preliminary studies on the characteristics of phenylalanine and  $\beta$ -methyl-glycoside transport in the tench intestine in vitro.

Comp. Biochem. Physiol. 62A, 363 - 370

**CHEN, T.S.T. und K.C. HUANG (1972):**

Structural specificity in the intestinal transport of hexoses, tyrosine derivatives and electrolytes in freshwater catfish.

J. Pharmac. exp. Therap. 180, 777 - 783

**CHUNG, Y.C., Y.S. KIM, A. SHADCHEHR, A. GARRIDO, J.L. MACGREGOR und M.H. SLEISENGER (1979):**

Protein digestion and absorption in human small intestine.

Gastroenterology 76, 1415 - 1421

**COULSON, R.A. und T. HERNANDEZ (1970):**

Protein digestion and amino acid absorption in the cayman.

J. Nutr. 100, 810 - 826

**CRANE, R.X. (1968):**

A concept of the digestive-absorptive surface of the small intestine. In: Handbook of Physiology, Section 6: Alimentary canal, Vol. V: Bile; Digestion; Ruminal Physiology, (Ed. C.F. CODE und W. HEIDEL), Waverly Press Baltimore, 2535 - 2542

CURRAN, P.F., S.G. SCHULTZ, R.A. CHEZ und R.E. FUISZ (1967):  
Kinetic relation of Na-amino acid interaction at the  
mucosal border of intestine.

J. gen. Physiol. 50, 1261 - 1286

DABROWSKI, K. (1983a):

Digestion of protein and amino acid absorption in  
stomachless fish, common carp (*Cyprinus carpio* L.).

Comp. Biochem. Physiol. 74A, 409 - 415

DABROWSKI, K. (1983b):

Comparative aspects of protein digestion and amino acid  
absorption in fish and other animals.

Comp. Biochem. Physiol. 74A (2), 417 - 425

DABROWSKI, K. und H. DABROWSKA (1981):

Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri*  
Rich.) and absorption of amino acid within the  
alimentary tract.

Comp. Biochem. Physiol. 69A, 99 - 111

DAVENPORT, H.W. (1971):

Physiologie der Verdauung. Eine Einführung. F.K.  
Schattauer Verlag Stuttgart - New York, 239 - 244

DE LA NOUE, J. (1970):

Anaerobic glucose stimulation of amino acid transfer in  
everted small intestine.

Biochim. biophys. Acta 203, 360 - 362

DELONG, D.C., J.E. HALVER und E.T. MERTZ (1958):

Nutrition of salmonid fishes. VI. Protein requirements  
of Chinook Salmon at two water temperatures.

J. Nutr. 65, 589 - 599

EZEASOR, D.N. (1978):

The gut of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*): A gross  
histological and ultrastructural study with some aspects  
of functional significance.

Ph. D. thesis, University of Edinburgh

EZEASOR, D.M. und W.M. STOKOE (1980):

Scanning electron microscopic study on the gut mucosa of the rainbow trout.

J. Fish Biol. 17, 619 - 634

EZEASOR, D.M. und W.M. STOKOE (1981):

Light and electron microscopic studies on the absorptive cells of the intestine, caeca and rectum of the adult rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Rich.

J. Fish Biol. 18, 527 - 544

FINCH, L.R. und F.J.H. HIRD (1960):

The uptake of amino acids by isolated segments of rat intestine - II. A survey of affinity for uptake from rates of uptake and competition for uptake.

Biochim. biophys. Acta 43, 278 - 287

FRIEDRICH, M. (1982):

Die intestinale Phase der Peptidabsorption.

Die Nahrung 26, 887 - 901

GANAPATHY, V., und F.H. LEIBACH (1982):

Peptide transport in intestinal and renal brush border membrane vesicles.

Life Sci. 30, 2137 - 2146

GARG, V.K. (1981a):

Effect of Na<sup>+</sup> on in vivo transport of glycine and leucine in two teleosts.

Z. Tierphysiol. Tiernahr. Futtermittelkd. 46 (4), 196 - 202

GARG, V.K. (1981b):

Effect of inhibitors on sugar and amino acid transport in two teleosts.

Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 58 (4), 299 - 305

SARG, V.I. und K.V. SASTRY (1976):

Intestinal transport of fructose and glycine in  
*Sphiocephalus punctatus*:

Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 48 (1), 35 - 40

SASIRE, H.R. und B.W. INCE (1984):

Intestinal transport of leucine in intact and  
gonadectomized underyearling rainbow trout, *Salmo*  
*gairdnerii* RICHARDSON.

Comp. Biochem. Physiol. 79A (3), 349 - 352

SASIMIRA, S., E.C.C. LIM, A.H. SAMIY und T.H. WILSON (1961):

Active transport of lysine, ornithine, arginine, and  
cystine by the intestine.

Biochem. biophys. Res. Commun. 4, 478 - 481

SCHADWIG, R.S., H.F. SCHMID, L.D. STEGINK und D.L. MILLER

(1977):

Intestinal absorption of glycine and glycyl-proline in  
the rat.

J. Biol. Sci. mol. Med. 52, 607 - 614

SEKULIER, M.D., C.D. HOLDWORTH, I. MCCOLL und D. PERETT (1972):

Dipeptide absorption in man.

Gut 13, 905 - 909

SEKIGUCHI, I. und R. JORDANA (1973):

The effect of temperature and absence of sodium on the  
oxygen uptake, water and D-galactose transfer by  
intestinal sacs of fish, *Gobius paganellus* L.

Rev. exp. Fisiol. 23, 33 - 38

SCHUBERT, S.S. und J. LEVNER (1973):

The effect of preloaded amino acids on lysine and  
homocysteine transport in chicken small intestine.

Comp. Biochem. Physiol. 44A, 1 - 16

HOFER, R. (1982):

Protein digestion and proteolytic activity in the digestive tract of an omnivorous cyprinid

Comp. Biochem. Physiol. 72A (1), 55 - 63

HOKAZONO, S., Y. TANAKA, T. KATAYAMA, C.O. CHICHESTER und K.L. SIMPSON (1979):

Intestinal transport of L-lysine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*.

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 45 (7), 845 - 848

HUANG, K.C. und W.R. ROUT (1967):

Intestinal transport of sugar and aromatic amino acids in killifish, *Fundulus heteroclitus*.

Am. J. Physiol. 212, 799 - 803

INGHAM, L. und C. ARME (1977):

Intestinal absorption of amino acids by rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson).

J. comp. Physiol. 117B, 323 - 334

IWAI, T. (1968):

Fine structure and absorption patterns of intestinal epithelial cells in rainbow trout alevins.

Z. Zellforsch. mikroskop. Anat. 91, 366 - 379

KEMP, P. und M.W. SMITH (1970):

Effect of temperature acclimatization on fatty acid composition of goldfish intestinal lipids.

Biochem. J. 117, 9 - 15

KITCHIN, S.E. und D. MORRIS (1971):

The effect of acclimation temperature on amino acid transport in the goldfish intestine.

Comp. Biochem. Physiol. 40A, 431 - 443

KREBS, H.A. und K. HENSELEIT (1932):

Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 210, 33 - 66

LECCE, J.G. (1966):

Absorption of macromolecules by neonatal intestine.

Biol. Neonat. 9, 50 - 61

LERNER, J. (1978):

A review of amino acid transport processes in animal cells and tissues.

University of Maine at Orono Press.

LINEWEAVER, H. und D. BURK (1934):

The determination of enzyme dissociation constants.

J. Am. Chem. Soc. 56, 658 - 666

LUSIER, A.-L. und J.W.L. ROBINSON (1973):

Inhibition of intestinal sugar and amino acid transport by n-butyl-biguanide. In: Comparative Physiology (Edited by BOLIS, L., K.SCHMIDT-NIELSEN und S.H.P. MADDRELL), 465 - 475

MARCOTTE, G. und J. DE LA NOÛE (1984):

In vitro intestinal absorption of glycine and L-alanine by rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, Rich.

Comp. Biochem. Physiol. 79A (2), 209 - 213

MATTHEWS, D.M. (1975):

Intestinal absorption of peptides.

Physiol. Rev. 55, 537 - 608

MATTHEWS, D.M. und D. BURSTON (1983):

Uptake of L-leucyl-L-leucine and glycylsarcosine by hamster jejunum in-vitro.

Clin. Sci. mol. med. 65, 177 - 184

MEPHAM, T.B. und M.W. SMITH (1966a):

Amino acid transport in goldfish intestine.

J. Physiol., Lond. 184, 673 - 684

- MEPHAM, T.B. und M.W. SMITH (1966b):**  
Regulation of amino acid transport across intestines of goldfish acclimated to different environmental temperatures.  
*J. Physiol., Lond.* 186, 619 - 631
- MERTZ, E.T. (1972):**  
The protein and amino acid needs. In: Fish Nutrition (J.E. HALVER Ed.), Academic Press, New York and London, 105 - 143
- MUNCK, B.G. (1981):**  
Intestinal absorption of amino acids. In: Physiology of the gastrointestinal tract Vol 2 (L. R. JOHNSON ed) Raven Press  
New York, 1097 - 1122
- MUNCK, B.G. (1984):**  
Lysine transport in the guinea-pig small intestine.  
*Biochim. biophys. Acta* 770, 34 - 39
- MUNCK, B.G. (1985):**  
Transport of imino acids and non- $\alpha$ -amino acids across the brush border membrane of the rabbit ileum.  
*J. Membrane Biol.* 83, 15 - 24
- MUNCK, B.G. und S.G. SCHULTZ (1969):**  
Lysine transport across isolated rabbit ileum.  
*J. gen. Physiol.* 153, 157 - 182
- NEAME, K.D. und T.G. RICHARDS (1972):**  
Elementary kinetics of membrane carrier transport.  
Blackwell Scientific Publications, Oxford, 53 - 55, 56 - 79
- NEFF, S.S. und X.J. MUSACCHIA (1967):**  
Intestinal absorption of L-leucine in vitro in fish (*Stenotonus versicolor* and *Ictalurus nebulosus*).  
*Comp. Biochem. Physiol.* 21, 337 - 343

NIXON, S.E. und G.E. MAWER (1970):

The digestion and absorption of protein in man. 2. The form in which digested protein is absorbed.

Br. J. Nutr. 24, 241 - 258

NOILLAC-DEPEYRE, J. und N. GAS (1973):

Absorption of protein macromolecules by the enterocytes of the carp (*Cyprinus carpio* L.). Ultrastructural and cytochemical study.

Z. Zellforsch. mikr. Anat. 146, 525 - 541

OGINO, C. (1980):

Requirements of carp and rainbow trout for essential amino acids

Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46, (2), 171

PERES, G. (1979):

Intestinal absorption of proteins and carbohydrates. In: Fish nutrition proceedings coll. CNERNA, Paris; France.

PETRICH, M. (1982)

Einfluß calcinogener Pflanzen auf den Calcium- und Phosphat-Transport im isolierten Rattendarm.

Vet. med. Diss., München 1982

PIERCE, A.E. (1960):

$\beta$ -lactoglobulins in the urine of the newborn suckled calf.

Nature, Lond. 188, 940 - 941

PRESTON, R.L., J. SCHAEFER und P.F. CURRAN (1974):

Structure-affinity relationships of substrates for the neutral amino acid transport system in rabbit ileum.

J. gen. Physiol. 64, 443 - 467

READ, C.P. (1967):

Studies on membrane transport. I. A common transport system for sugars and amino acids.

Biol. Bull. 133, 630 - 642

- READ, C.P., J.E. SIMMONS Jr., J.W. CAMPBELL und A.H. ROTHMAN (1960):  
Permeation and membrane transport in parasitism: studies on tapeworm-elasmobranch symbiosis.  
Biol. Bull. 119, 120 - 133
- REISER, S. und P.A. CHRISTIANSEN (1973):  
The properties of Na<sup>+</sup>-dependent and Na<sup>+</sup>-independent lysine uptake by isolated intestinal epithelial cells.  
Biochim. biophys. Acta 307, 212
- ROUT, W.R., D.ST. LIN und K.C. HUANG (1965):  
Intestinal transport of amino acids and glucose in flounder fish.  
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 118, 933 - 938
- RUMSEY, G.L. und H.G. KETOLA (1975):  
Amino acid supplementation of casein in diets of atlantic salmon (*Salmo salar*) fry and of soybean meal for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings.  
J. Fish. Res. Board Can. 32 (3), 422
- SACHS, L. (1974):  
Angewandte Statistik, 4. Auflage,  
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- SACHS, L. (1982):  
Statistische Methoden  
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York
- SCHACHTER, D., E.B. DOWDLE und H. SCHENKER (1960):  
Accumulation of <sup>45</sup>Ca by slices of small intestine.  
Am. J. Physiol. 198, 275 - 279
- SCHARREER, E. (1978):  
Concentrative amino acid uptake at the serosal side of colon mucosa.  
Pflügers Archiv 376, 245 - 249

SCHARRER, E. (1986):

Epithelialer Transport von Aminosäuren und Peptiden.

Übers. Tierernährg. 14, 233 - 250

SCHARRER, E., S. WOLFFRAM, W. RAAB, B. AMANN und N. AGNE (1981):

Adaptive changes of amino acid and sugar transport  
across the brush border of rat jejunum.

In: Falk Symposium 30 (Ed. ROBINSON, J.W.L, R.H. DOWLING  
und E.O. RIECKEN): Mechanisms of Intestinal Adaption,  
MTP Press Limited, Lancaster - Boston - The Hague, 123 -  
139

SCHUBERT, G. (1979):

Anatomie und Physiologie des Verdauungsapparats der  
Nutzfische.

Übers. Tierernährg. 7, 31 - 50

SCHULTZ, S.G. und P.F. CURRAN (1970):

Coupled transport of sodium and organic solutes.

Physiol. Rev. 50, 637 - 718

SCHULTZ, S.G., L. YU-TU und C.K. STRECKER (1972):

Influx of neutral amino acids across the brush border  
of rabbit ileum.

Biochim. biophys. Acta 288, 367 - 379

SEPULVEDA F.V. und M.W. SMITH (1978):

Discrimination between different entry mechanisms for  
neutral amino acids in rabbit ileal mucosa.

J. Physiol. (London) 282, 73 - 90

SIGRIST-NELSON, K., H. MURER und U. HOPFER (1975):

Active alanine transport in isolated brush border  
membranes.

J. biol. Chem. 250, 5674 -5680

SMITH, M.W. (1966):

Sodium-glucose interactions in the goldfish intestine.

J. Physiol., Lond. 182, 559 - 573

SMITH, M.W. (1970):

Selective regulation of amino acid transport by the intestine of goldfish (*Carassius auratus* L.).

Comp. Biochem. Physiol. 35, 387 - 401

SMITH, M.W. und J.C. ELLORY (1971):

Sodium-amino acid interaction in the intestinal epithelium.

Phil. Trans. R. Soc. 262B, 131 - 140

SMITH, R.L. (1969):

Intestinal amino-acid transport in the marine teleost, *Haemulon plumieri*.

Comp. Biochem. Physiol. 30, 1115 - 1123

STEINHARDT, H.J. und S.A. ADIBI (1986):

Kinetics and characteristics of absorption from an equimolar mixture of 12 glycyl-dipeptides in human jejunum.

Gastroenterology 90, 577 - 582

STEVENS, B.R. und E.M. WRIGHT (1985):

Substrate specificity of intestinal brush border proline (sodium (IMINO) transporter).

J. Membrane Biol. 87, 27 - 34

STEVENS, B.R., J.O. KAUNITZ und E.M. WRIGHT (1984):

Intestinal transport of amino acids and sugars: advances using membrane vesicles.

Ann. Rev. Physiol. 46, 417 - 433

STEVENS, B.R., H.J. ROSS und E.M. WRIGHT (1982):

Multiple transport pathways for neutral amino acids in rabbit jejunal brush border vesicles.

J. Membrane Biol. 66, 213 - 225

STOKES, R.M. und P.O. FROMM (1964):

Glucose absorption and metabolism by the gut of rainbow trout.

Comp. Biochem. Physiol. 13, 53 - 69

STROBAND, H.W.J. und F.M.W. DEBETS (1978):

The ultrastructure and renewal of the intestinal epithelium of the juvenile grasscarp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.).

Cell. Tiss. Res. 187, 181 - 200

STROBAND, H.W.J., H. MEER und L.P.M. TIMMERMANS (1979):

Regional functional differentiation in the gut of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.).

Histochemistry 64, 235 - 249

THOMPSON, K.A. und A. KLEINZELLER (1985):

Glucose transport in intestinal epithelia of winter flounder

Am. J. Physiol. 248, R573 - R577

WARD, W.E. (1968):

The uptake of amino acids by intestinal segments of the trout, *Salmo gairdneri*.

Ph. D. Thesis, College of Arts and Sciences, Kent State University, Ohio, U.S.A.

WILSON, T.H. (1957):

In vitro studies on intestinal absorption of fish.

Biol. Bull. 113, 362

WILSON, T.H. und G. WISEMAN (1954):

The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface.

J. Physiol. (London) 123, 116 - 125

WISEMAN, G. (1951):

Active stereochemically selective absorption of amino-acids from rat small intestine.

J. Physiol. 114, 7 - 8

WISEMAN, G. (1968):

Absorption of amino acids. In: Handbook of physiology, Sect. 6, Alimentary canal, Vol. 3.: Intestinal absorption (Ed. C.F. CODE W. HEIDEL), Waverly Press Baltimore, 1277 -1307

WOLFFRAM, S., H. GIERING und E. SCHARRER (1984):

Na<sup>+</sup>-gradient dependence of basic amino transport into rat intestinal brush border membrane vesicles.

Comp. Biochem. Physiol. 78A, 475 - 480

YAMAMOTO, T. (1966):

An electron microscopic study on the columnar epithelial cell of freshwater teleosts: goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo irideus*).

Z. Zellforsch. mikrosk. Anat. 72, 66 - 87

YARZOMBEK, A.A., T.V. SCHERBINA, B.I. ZDOR, L.A. PINCHUKOV und I.F. GMYRYA (1981):

The rate of absorption of some substances in the intestine of carp, *Cyprinus carpio* L.

Vopr. Ikhtiolog. 21, 565 - 567

ZEITOUN, I.H., D.E. ULLREY und P.I. TACK (1974):

Effects of water salinity and dietary protein levels on total serum protein and haematocrit of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*).

J. Fish. Res. Bd Can. 31, 1133 - 1134

8. ANHANG

TABELLE A1

| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen juveniler Forellen nach<br>einstündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |            |             |             |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol Lysin/l                                                                                                                       |            |             |             |             |
| INKUBATIONSDAUER: 60 min                                                                                                                                      |            |             |             |             |
| Temperatur                                                                                                                                                    |            | 5 °C        | 15 °C       | 25 °C       |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                                | <s> mmol/l | 0,47 ± 0.01 | 0,60 ± 0,04 | 0,68 ± 0.02 |
|                                                                                                                                                               | <m> mmol/l | 0,53 ± 0,02 | 0,54 ± 0,05 | 0,50 ± 0,01 |
|                                                                                                                                                               | s/m        | 0,88 ± 0,04 | 1,10 ± 0,05 | 1,36 ± 0,05 |
|                                                                                                                                                               | p*         | p < 0,005   | n.s.        | p < 0,001   |
|                                                                                                                                                               | s. T.**    | ----        |             | 2,88 ± 1,34 |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                  |            | 6           | 9           | 7           |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                               |            | 73,3 ± 9,7  | 64,4 ± 10,9 | 64,3 ± 6,8  |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                    | <serös>    | 0,44 ± 0.01 | 0,48 ± 0.02 | 0,48 ± 0.04 |
|                                                                                                                                                               | <mucös>    | 0,50 ± 0,01 | 0,51 ± 0,03 | 0,46 ± 0,02 |
|                                                                                                                                                               | s/m        | 0,87 ± 0,03 | 0,94 ± 0,07 | 1,04 ± 0,03 |
|                                                                                                                                                               | p*         | p < 0,005   | n.s.        | n.s.        |
|                                                                                                                                                               | s. T.**    | ----        | ----        | ----        |
| <p>*p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.:nicht signifikant</p> <p>** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)</p>                      |            |             |             |             |

TABELLE A2

| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen juveniler Forellen nach<br>einstündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |         |             |             |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------------|-------------|
| AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol Lysin/l<br>INKUBATIONSDAUER: 60 min                                                                                           |         |             |             |             |
| Temperatur                                                                                                                                                    |         | 5 °C        | 15 °C       | 25 °C       |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                                | <serös> | 0,99 ± 0,06 | 1,08 ± 0,08 | 1,25 ± 0,10 |
|                                                                                                                                                               | <mucös> | 1,10 ± 0,06 | 1,04 ± 0,05 | 0,93 ± 0,02 |
|                                                                                                                                                               | s/m     | 0,90 ± 0,09 | 1,04 ± 0,06 | 1,34 ± 0,10 |
|                                                                                                                                                               | p*      | p < 0,01    | n.s.        | p < 0,001   |
|                                                                                                                                                               | s. T.** | ----        | ----        | 4,90 ± 1,02 |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                  |         | 6           | 8           | 7           |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                               |         | 69,8 ± 3,9  | 64,5 ± 12,9 | 75,7 ± 11,3 |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                    | <serös> | 0,94 ± 0,03 | 0,91 ± 0,04 | 0,89 ± 0,05 |
|                                                                                                                                                               | <mucös> | 1,02 ± 0,03 | 0,96 ± 0,06 | 0,91 ± 0,06 |
|                                                                                                                                                               | s/m     | 0,92 ± 0,04 | 0,95 ± 0,06 | 0,92 ± 0,07 |
|                                                                                                                                                               | p*      | p < 0,005   | n.s.        | n.s.        |
|                                                                                                                                                               | s. T.** | ----        | ----        | ----        |
| <p>*p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.:nicht signifikant</p> <p>** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)</p>                      |         |             |             |             |

TABELLE A3

| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen juveniler Forellen nach<br>zweistündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |         |             |             |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol Lysin/l                                                                                                                        |         |             |             |              |
| INKUBATIONSDAUER: 120 min                                                                                                                                      |         |             |             |              |
| Temperatur                                                                                                                                                     |         | 5 °C        | 15 °C       | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                                 | <serös> | 0,46 ± 0,03 | 0,77 ± 0,01 | 1,02 ± 0,11  |
|                                                                                                                                                                | <mucös> | 0,51 ± 0,02 | 0,45 ± 0,03 | 0,49 ± 0,03  |
|                                                                                                                                                                | s/m     | 0,92 ± 0,09 | 1,69 ± 0,03 | 2,08 ± 0,17  |
|                                                                                                                                                                | p*      | p < 0,025   | p < 0,005   | p < 0,001    |
|                                                                                                                                                                | s. T.** | ----        | 5,59 ± 1,31 | 11,44 ± 2,45 |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                   |         | 6           | 8           | 8            |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                                |         | 82,3 ± 10,4 | 67,2 ± 10,4 | 75,7 ± 11,3  |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                     | <serös> | 0,43 ± 0,01 | 0,52 ± 0,09 | 0,56 ± 0,08  |
|                                                                                                                                                                | <mucös> | 0,48 ± 0,04 | 0,45 ± 0,03 | 0,46 ± 0,04  |
|                                                                                                                                                                | s/m     | 0,88 ± 0,03 | 1,17 ± 0,11 | 1,21 ± 0,16  |
|                                                                                                                                                                | p*      | p < 0,05    | n.s.        | n.s.         |
|                                                                                                                                                                | s. T.** | ----        | ----        | ----         |

\*p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.: nicht signifikant

\*\* s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)

TABELLE A4

| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen juveniler Forellen nach<br>zweistündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |         |             |             |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------|-------------|--------------|
| AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol Lysin/l                                                                                                                        |         |             |             |              |
| INKUBATIONSDAUER: 120 min                                                                                                                                      |         |             |             |              |
| Temperatur                                                                                                                                                     |         | 5 °C        | 15 °C       | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                                 | <serös> | 0,86 ± 0,05 | 1,35 ± 0,12 | 1,58 ± 0,13  |
|                                                                                                                                                                | <mucös> | 0,95 ± 0,03 | 1,05 ± 0,03 | 1,03 ± 0,12  |
|                                                                                                                                                                | s/m     | 0,91 ± 0,03 | 1,29 ± 0,11 | 1,54 ± 0,17  |
|                                                                                                                                                                | p*      | p < 0,005   | p < 0,001   | p < 0,005    |
|                                                                                                                                                                | s. T.** | ----        | 7,84 ± 2,50 | 14,34 ± 4,44 |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                   |         | 6           | 7           | 6            |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                                |         | 79,2 ± 13,3 | 65,4 ± 7,4  | 73,7 ± 10,6  |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                     | <serös> | 0,80 ± 0,05 | 1,00 ± 0,09 | 1,01 ± 0,13  |
|                                                                                                                                                                | <mucös> | 0,92 ± 0,02 | 0,93 ± 0,02 | 0,85 ± 0,09  |
|                                                                                                                                                                | s/m     | 0,86 ± 0,05 | 1,08 ± 0,12 | 1,21 ± 0,28  |
|                                                                                                                                                                | p*      | p < 0,005   | p < 0,05    | p < 0,025    |
|                                                                                                                                                                | s. T.** | ----        | ----        | ----         |
| *p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.:nicht signifikant                                                                                                |         |             |             |              |
| ** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)                                                                                                     |         |             |             |              |

TABELLE A5

|                                                                                                                                                             |         |              |              |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen adulter Forellen nach<br>einstündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |         |              |              |              |
| AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol Lysin/l                                                                                                                     |         |              |              |              |
| INKUBATIONSDAUER: 60 min                                                                                                                                    |         |              |              |              |
| Temperatur                                                                                                                                                  |         | 5 °C         | 15 °C        | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                              | <serös> | 0,45 ± 0,02  | 0,47 ± 0,01  | 0,53 ± 0,02  |
|                                                                                                                                                             | <mucös> | 0,52 ± 0,03  | 0,50 ± 0,01  | 0,49 ± 0,02  |
|                                                                                                                                                             | s/m     | 0,87 ± 0,05  | 0,94 ± 0,02  | 1,08 ± 0,09  |
|                                                                                                                                                             | p*      | p < 0,005    | p < 0,025    | p < 0,05     |
|                                                                                                                                                             | s. T.** | ----         | ----         | 1,00 ± 0,37  |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                |         | 6            | 6            | 6            |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                             |         | 420,7 ± 40,9 | 343,8 ± 55,2 | 512,0 ± 71,4 |
| R                                                                                                                                                           | <serös> | 0,43 ± 0,02  | 0,45 ± 0,03  | 0,44 ± 0,04  |
| E                                                                                                                                                           | <mucös> | 0,51 ± 0,01  | 0,47 ± 0,01  | 0,42 ± 0,02  |
| K                                                                                                                                                           | s/m     | 0,85 ± 0,04  | 0,96 ± 0,03  | 1,05 ± 0,10  |
| T                                                                                                                                                           | p       | p < 0,005    | n.s.         | n.s.         |
| U                                                                                                                                                           | s. T.   | ----         | ----         | ----         |
| M                                                                                                                                                           |         |              |              |              |
| *p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.: nicht signifikant                                                                                            |         |              |              |              |
| ** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)                                                                                                  |         |              |              |              |

TABELLE A6

|                                                                  |         |              |              |              |
|------------------------------------------------------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)           |         |              |              |              |
| umgestülpter Darmsäckchen adulter Forellen nach                  |         |              |              |              |
| einstündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C.                   |         |              |              |              |
| AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol Lysin/l                          |         |              |              |              |
| INKUBATIONSDAUER: 60 min                                         |         |              |              |              |
| Temperatur                                                       |         | 5 °C         | 15 °C        | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                   | <serös> | 0,90 ± 0,02  | 0,94 ± 0,03  | 1,07 ± 0,09  |
|                                                                  | <mucös> | 1,02 ± 0,01  | 1,01 ± 0,01  | 0,95 ± 0,04  |
|                                                                  | s/m     | 0,88 ± 0,02  | 0,93 ± 0,05  | 1,12 ± 0,09  |
|                                                                  | p*      | p < 0,005    | p < 0,005    | p < 0,005    |
|                                                                  | s. T.** | ----         | ----         | 2,02 ± 0,97  |
| Tierzahl (n)                                                     |         | 6            | 6            | 6            |
| Lebendmasse (g)                                                  |         | 466,9 ± 70,1 | 413,2 ± 62,1 | 482,2 ± 70,5 |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                       | <serös> | 0,86 ± 0,03  | 0,82 ± 0,02  | 0,95 ± 0,02  |
|                                                                  | <mucös> | 0,99 ± 0,02  | 0,90 ± 0,03  | 0,83 ± 0,04  |
|                                                                  | s/m     | 0,87 ± 0,04  | 0,91 ± 0,04  | 1,15 ± 0,06  |
|                                                                  | p*      | p < 0,005    | p < 0,005    | p < 0,005    |
|                                                                  | s. T.** | ----         | ----         | ----         |
| *p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.: nicht signifikant |         |              |              |              |
| ** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)       |         |              |              |              |

TABELLE A7

| <p>Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br/> umgestülpter Darmsäckchen adulter Forellen nach<br/> zweistündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C.</p> |         |              |              |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| <p>AUSGANGSKONZENTRATION: 0,5 mmol Lysin/l</p>                                                                                                                          |         |              |              |              |
| <p>INKUBATIONSDAUER: 120 min</p>                                                                                                                                        |         |              |              |              |
| Temperatur                                                                                                                                                              |         | 5 °C         | 15 °C        | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                                               | <serös> | 0,44 ± 0,01  | 0,52 ± 0,02  | 0,70 ± 0,10  |
|                                                                                                                                                                         | <mucös> | 0,49 ± 0,02  | 0,50 ± 0,01  | 0,47 ± 0,01  |
|                                                                                                                                                                         | s/m     | 0,89 ± 0,03  | 1,04 ± 0,03  | 1,49 ± 0,22  |
|                                                                                                                                                                         | p*      | p < 0,005    | p < 0,05     | p < 0,005    |
|                                                                                                                                                                         | s. T.** | ----         | 1,22 ± 0,28  | 4,56 ± 1,44  |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                            |         | 6            | 6            | 6            |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                                         |         | 402,3 ± 71,4 | 368,1 ± 35,6 | 469,4 ± 95,0 |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                              | <serös> | 0,40 ± 0,01  | 0,45 ± 0,01  | 0,48 ± 0,04  |
|                                                                                                                                                                         | <mucös> | 0,47 ± 0,04  | 0,48 ± 0,02  | 0,45 ± 0,01  |
|                                                                                                                                                                         | s/m     | 0,86 ± 0,03  | 0,94 ± 0,06  | 1,08 ± 0,08  |
|                                                                                                                                                                         | p*      | p < 0,005    | n.s.         | n.s.         |
|                                                                                                                                                                         | s. T.** | ----         | ----         | ----         |
| <p>*p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.: nicht signifikant<br/> ** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)</p>                                 |         |              |              |              |

TABELLE A8

| Lysinkonzentration im serösen und mucösen Medium (s,m)<br>umgestülpter Darmsäckchen adulter Forellen nach<br>zweistündiger Inkubation bei 5°, 15° und 25° C. |         |              |              |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------|--------------|--------------|
| AUSGANGSKONZENTRATION: 1,0 mmol Lysin/l                                                                                                                      |         |              |              |              |
| INKUBATIONSDAUER: 120 min                                                                                                                                    |         |              |              |              |
| Temperatur                                                                                                                                                   |         | 5 °C         | 15 °C        | 25 °C        |
| M<br>I<br>T<br>T<br>E<br>L<br>D<br>A<br>R<br>M                                                                                                               | <serös> | 0,91 ± 0,03  | 1,01 ± 0,01  | 1,33 ± 0,20  |
|                                                                                                                                                              | <mucös> | 1,01 ± 0,01  | 0,98 ± 0,02  | 0,93 ± 0,01  |
|                                                                                                                                                              | s/m     | 0,90 ± 0,03  | 1,03 ± 0,02  | 1,44 ± 0,22  |
|                                                                                                                                                              | p*      | p < 0,005    | n.s.         | p < 0,005    |
|                                                                                                                                                              | s. T.** | ----         | ----         | 9,74 ± 4,45  |
| Tierzahl (n)                                                                                                                                                 |         | 6            | 6            | 6            |
| Lebendmasse (g)                                                                                                                                              |         | 394,3 ± 36,8 | 468,3 ± 60,7 | 424,9 ± 67,2 |
| R<br>E<br>K<br>T<br>U<br>M                                                                                                                                   | <serös> | 0,84 ± 0,04  | 0,90 ± 0,04  | 0,93 ± 0,05  |
|                                                                                                                                                              | <mucös> | 0,97 ± 0,01  | 0,97 ± 0,03  | 0,91 ± 0,03  |
|                                                                                                                                                              | s/m     | 0,87 ± 0,04  | 0,93 ± 0,05  | 1,03 ± 0,06  |
|                                                                                                                                                              | p*      | p < 0,005    | p < 0,005    | n.s.         |
|                                                                                                                                                              | s. T.** | ----         | ----         | ----         |
| *p: U-Test (WILCOXON, MANN und WITHNEY)/ n.s.: nicht signifikant                                                                                             |         |              |              |              |
| ** s.T.: seröser Lysintransfer (µmol/g Darmtrockengewicht)                                                                                                   |         |              |              |              |



## D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. J. Gropp danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau B. Amann für die stets bereitwillige Hilfe bei der Versuchsdurchführung im Labor.



## LEBENS LAUF

Hans-Werner Wagner

|                            |                                                                                                                                                                                                   |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 20.11.1958                 | geboren in Oberthal/Saar<br>Vater: Arnold Wagner<br>Mutter: Hildegard Wagner, geb. Haab                                                                                                           |
| 1965 - 1969                | Grundschule in Oberthal/Saar                                                                                                                                                                      |
| 1969 - 1978                | Gymnasium Wendalinum in St. Wendel/Saar                                                                                                                                                           |
| 08.06.1978                 | Abitur                                                                                                                                                                                            |
| 1978 - 1979                | Grundwehrdienst                                                                                                                                                                                   |
| 1979 - 1985                | Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München                                                                                                                             |
| 20.02.1985                 | Staatsexamen                                                                                                                                                                                      |
| 12.04.1985                 | Approbation als Tierarzt                                                                                                                                                                          |
| 01.10.1985 -<br>30.04.1986 | Tätigkeit als teilzeitbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München. |
| seit 01.05.1986            | vollbeschäftigte wissenschaftliche Hilfskraft am oben genannten Institut.                                                                                                                         |





